

Rec'd PCT/PTO 17 MAY 2005

PCT/PT 2004/000309

RO/AR 16.02.2004

REC'D 09 MAR 2004

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0092086

Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 12월 16일

Date of Application DEC 16, 2003

출원인 : 학교법인 인하학원

Applicant(s) INHA UNIVERSITY

**PRIORITY  
DOCUMENT**

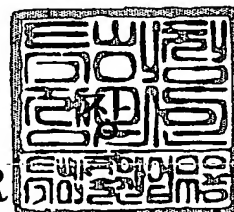
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2004 년 02 월 16 일

특 허 청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

|            |   |
|------------|---|
| 【서류명】      | 특허출원서   |
| 【권리구분】     | 특허  |
| 【수신처】      | 특허청장  |
| 【제출일자】     | 2003.12.16  |
| 【발명의 명칭】   | 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법   |
| 【발명의 영문명칭】 | MULTIPLE LAYER PHOTOBIOREACTORS AND METHOD FOR CULTURING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS USING THEM |
| 【출원인】      |   |
| 【명칭】       | 학교법인 인하학원   |
| 【출원인코드】    | 2-1998-097684-7   |
| 【대리인】      |   |
| 【성명】       | 이원희   |
| 【대리인코드】    | 9-1998-000385-9   |
| 【포괄위임등록번호】 | 2000-020536-1   |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 이철균   |
| 【성명의 영문표기】 | LEE, Choul-Gyun   |
| 【주민등록번호】   | 620501-1047818  |
| 【우편번호】     | 121-882   |
| 【주소】       | 서울특별시 마포구 창전동 437 삼성아파트 107동 1304호  |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 서인수   |
| 【성명의 영문표기】 | SUH, In Soo   |
| 【주민등록번호】   | 701110-1932317  |
| 【우편번호】     | 690-081   |
| 【주소】       | 제주도 제주시 도련1동 2253-1번지   |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 주현나   |
| 【성명의 영문표기】 | JOO, Hyun-Na  |
| 【주민등록번호】   | 800801-2330927  |

**【우편번호】** 232-949  
**【주소】** 강원도 평창군 진부면 하진부 8리 1반 177번지  
**【국적】** KR  
**【심사청구】** 청구  
**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 이원희 (인)  
**【수수료】**  
**【기본출원료】** 20 면 29,000 원  
**【가산출원료】** 35 면 35,000 원  
**【우선권주장료】** 0 건 0 원  
**【심사청구료】** 19 항 717,000 원  
**【합계】** 781,000 원  
**【감면사유】** 학교  
**【감면후 수수료】** 390,500 원  
**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)\_1통

## 【요약서】

## 【요약】

본 발명은 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법에 관한 것으로, 구체적으로 균체 및 배양액을 담을 수 있는 한 개 이상의 균체성장용 배양영역; 및 상기 균체 성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 유용산물을 생산할 수 있는 균체 및 배양액을 담을 수 있는 한 개 이상의 유용산물 생산용 배양영역으로 이루어진 것으로, 상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 생산용 배양영역은 투명판으로 이루어진 분리장치를 이용하여 분리되고, 유용물질의 생산을 유도하기에 충분히 강한 빛이 유용산물 생산용 배양영역을 조사한 후, 상기 영역을 통과하는 과정에서 세포의 성장에 적절한 광도로 낮아진 빛이 균체성장용 배양영역에 도달하도록 설치된 것을 특징으로 하는 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법에 관한 것이다.

본 발명의 다중 광생물반응기는 균체 성장과 유용 대사산물 생산의 최적 환경 상태가 뚜렷한 차이를 나타내는 광합성 미생물을 배양시킬 수 있는 것으로, 먼저 태양광 또는 인공광원의 빛에너지를 유용산물 생산용 배양영역의 방향으로 공급함으로써 균체내 유용 대사산물을 축적시킨다. 이때 균체성장용 배양영역으로 공급되는 빛에너지는 유용산물 생산용 배양영역내 균체 자체로 인한 그림자 효과로 인하여 균체 성장에 적합한 광도로 감소하게 되며, 이렇게 감소된 빛에너지를 균체성장용 배양영역에 공급함으로써 균체를 성장시킬 수 있게 된다.

이러한 장치를 이용한 광합성 미생물의 배양방법은 종래 균체성장용 배양조와 유용산물 생산용 배양조를 각각 설치하여 수행하던 배양을, 1개의 배양조에서 조절된 빛의 조사에 의해 균체성장과 유용산물 생산을 위한 배양을 동시에 수행할 수 있어 균체의 고농도 속성배양과 효



과적인 유용산물 생산이 동시에 가능하게 되어, 상대적으로 적은 공간에서 적은 노력으로, 상대적으로 높은 에너지 효율로 유용물질을 생산할 수 있다.

**【대표도】**

도 1a

**【색인어】**

광생물반응기, 유용산물, 광합성 미생물, 균체성장, 배양방법.

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법 {MULTIPLE LAYER PHOTOBIOREACTORS AND METHOD FOR CULTURING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS USING THEM}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1a 및 도 1b는 외부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 2a 및 도 2b는 외부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 3a 및 도 3b는 태양광을 이용한 관형(tubular) 광생물반응기의 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 4a 및 도 4b는 내부 조사형 이중 평면판 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 5a 및 도 5b는 도 4의 내부 조사형 이중 평면판 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 6a 및 도 6b는 외○내부 조사형 삼중 평면판(triple flat-plate) 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 7a 및 도 7b는 도 6의 외○내부 조사형 삼중 평면판 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 8a 및 도 8b는 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 9a 및 도 9b는 도 8의 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 10a 및 도 10b는 외○내부 조사형 삼중 수직원통(triple cylinder) 형태의 광생물반응기의 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 11a 및 도 11b는 도 10의 외○내부 조사형 삼중 수직원통 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타내는 측면도 및 단면도이며,

도 12a 및 도 12b는 하부 기체 주입형 이중 수직원통 형태의 기포탑 광생물반응기에 외부 발광체가 구비된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 12c는 도 12a의 광생물반응기를 이용한 실시예 1의 배양시간의 경과에 따른 생체중량의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 12d는 도 12a의 광생물반응기를 이용한 실시예 1의 배양시간의 경과에 따른 아스타잔틴(astaxanthin) 양의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 13a 및 도 13b는 기체 주입방법이 다른 상부 및 하부 기체 주입형 이중 수직원통 형태의 기포탑 광생물반응기에 외부 발광체가 구비된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 13c는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 2의 배양시간의 경과에 따른 생체중량의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 13d는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 2의 배양시간의 경과에 따른 아스타잔틴 양의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 14a는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 3의 배양시간의 경과에 따른 생체중량의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 14b는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 3의 배양시간의 경과에 따른 아스타잔틴 양의 변화를 나타낸 그래프이다.

#### <도면의 주요부분에 대한 부호의 설명>

- 1 : 유용산물 생산용 배양영역    2 : 균체성장용 배양영역
- 3 : 빛에너지    4 : 지면
- 5 : 유용산물 생산용 배양영역의 가스 주입구
- 6 : 균체성장용 배양영역의 가스 주입구
- 7 : 기포    8 : 직관 형광램프

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<26> 본 발명은 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법에 관한 것으로, 구체적으로 균체 성장과 유용 대사산물 생산의 최적 환경 상태가 뚜렷한 차이를 나타내는 광합성 미생물을 배양하기 위한 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법에 관한 것이다.

- 27> 최근 국내외적으로 생명공학의 새로운 개척분야로서 조류 생물공학(algal biotechnology)에 대한 관심이 높아지고 있다. 상기 조류 생물공학은 여러 광합성 미생물로부터 다양한 고부가가치의 유용산물을 발견 및 분리하는 것으로, 이러한 광합성 미생물로부터 얻어진 유용산물은 고부가가치의 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강식품; 카로테노이드(carotenoids), 빌리프로테인(biliprotein) 등의 염료; 바이오플로쿨런트(bioflocculant), 폴리올(polyols), 탄수화물 등의 정제 화학약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료로 활용되고 있다.
- <28> 이러한 광합성 미생물 중에는 균체성장과 유용산물 생산이 서로 다른 환경조건을 요구하는 것이 특징으로 하는 종들이 알려져 있으며, 이들 광합성 미생물로부터 유용산물을 얻기 위하여 일반적으로 두 단계로 구성된 공정을 수행하고 있다. 첫 번째 단계에서는 균체성장에 적합한 배양조건(optimal growth condition)을 유지하여 균체를 성장시키며, 두 번째 단계에서는 이렇게 성장된 균체로부터 유용산물을 얻기 위해 적합한 배양조건(stressed condition)을 유지하여 균체가 더 이상 성장하지 않는 정지기(stationary phase) 기간 동안 유용산물을 생산한다. 이렇게 얻어진 유용산물은 균체성장과 무관하게 생성되는 관계로 2차 대사산물(secondary metabolite) 또는 비생장관련산물(nongrowth-associated product)이라고 한다.
- <29> 이러한 특징을 갖는 광합성 미생물에는 해마토코쿠스(*Haematococcus* sp.), 듀나리엘라(*Dunaliella* sp.), 클로로코쿰(*Chlorococcum* sp.), 클로렐라(*Chlorella* sp.), 아세타블라리아(*Acetabularia* sp.), 마이크로시스티스(*Microcystis* sp.), 노스톡(*Nostoc* sp.), 오실레토리아(*Oscillatoria* sp.)

*Oscillatoria* sp.) 등이 있다. 그 중 특히 해마토코쿠스는 항산화제로 유용하게 사용되고 있는 아스타잔틴(astaxantin)을 유용산물로서 생산할 수 있다.

- <30> 이러한 것을 기초로 하여 종래 광합성 미생물을 이용한 고부가 유용산물의 생산방법은 균체성장용 배양조와 유용산물 생산용 배양조를 각각 설치한 2 단계 생물공정으로 이루어져 있다. 구체적으로, 단계 1 공정에서는 균체성장용 배양조에서 균체 성장에 적합한 성장조건(optimal growth condition)을 유지하는 방법으로 균체의 고농도 속성배양을 구현하고, 단계 2 공정에서는 유용산물 생산용 배양조에서 적정 환경조건을 유지하여 상기 단계 1 공정에서 확보된 바이오매스(biomass)에서 유용산물(2차 대사산물)을 효과적으로 생산하는 것으로 이루어져 있다(미합중국특허 제5,882,849호; 제6,022,701호).
- <31> 상기 각각 설치된 2개의 배양조를 구비한 배양기술은 각각의 조건을 갖는 배양조를 구비하고, 그 목적에 적합한 성장조건을 구현함으로써, 종래 연못(pond) 형태나 외륜(paddle wheel)으로 배지를 순환시키는 수로(raceway) 형태의 옥외배양법에 비해 고농도 배양이 용이하고 다른 미생물에 의해 오염되는 것을 막을 수 있어 유용산물의 회수비용을 줄일 수 있는 장점이 있다.
- <32> 그러나, 상기 각각 설치된 2개의 배양조를 구비한 배양기술은 해결해야 할 여러 문제점들이 있다. 구체적으로, 균체의 성장을 위한 단계 1 공정의 배양조와 유용산물의 생산을 위한 단계 2 공정의 배양조를 각각 설치해야 하는 관계로, 이에 따른 지대(land cost)나 설치비 및 운전비가 증가하게 되고, 복잡한 조업을 수행함으로써 고도의 숙련된 기술자가 필요하게 된다.

또한, 이로 인하여 광합성 미생물에서 유래된 고부가 유용산물의 생산공정을 상용화하는데 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다.

### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <33> 본 발명의 목적은 상기 기술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 구체적으로 특정 광합성 미생물을 이용하여 고부가 유용산물을 생산하는 경우, 내부영역을 균체성장 영역과 유용산물 생산영역으로 구분된 다중 광생물반응기를 이용함으로써, 균체 성장을 위한 배양 및 유용산물 유도에 필요한 노동력을 줄일 수 있으며, 경제적으로 유용산물을 얻을 수 있는 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법을 제공하는 것이다.

### 【발명의 구성 및 작용】

- <34> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역; 상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역; 및 상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 양자 사이에 형성된 투명분리장치를 포함하여 이루어지며, 배양을 위해 조사되는 태양광 또는 인공광이 유용산물 배양영역을 통과한 후 투명분리장치를 거쳐 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 유용산물 배양영역은 반응기내의 외측에 형성되며, 균체성장용 배양영역은 반응기 내의 내측에 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기를 제공하는 것이다. 또한, 상기 기술된 바와 같은 균체성장용 배양영역, 유용산물 배양영역 및 투명분리장치를 포함하며, 추가로 광을 조사하기 위한 광조사장치를 포함하여 이루어지

며, 광조사장치를 통해 조사되는 광이 상기 유용산물 배양영역을 통과한 후 투명분리장치를 거쳐 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 유용산물 배양영역은 광조사장치와 접하도록 형성되고, 균체성장용 배양영역은 광조사장치와 접하지 않도록 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기를 제공하는 것이다.

<35> 또한, 본 발명은 상기 다중 광생물반응기를 이용한 광합성 미생물의 배양방법을 제공하는 것이다.

<36> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<37> 본 발명은 다중 광생물반응기를 제공한다.

<38> 먼저, 본 발명의 다중 광생물반응기는 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역과 상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역으로 이루어져 있으며, 상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 양 영역 사이에 형성된 투명분리장치를 포함하여 이루어진다.

<39> 이러한 광생물반응기의 구조로 인해 본 발명의 다중 광생물반응기는 광원에 가까운 쪽에 형성된 유용산물 생산용 배양영역에 과도한 빛에너지를 공급할 수 있으며, 그로 인해 유용산물 생산용 배양영역내의 특정 균체가 고광도의 빛에너지를 이용하여 대사산물을 축적할 수 있도록 유도한다. 이때, 빛에너지는 상기 유용물질 생산용 배양영역을 통과하면서 배양액내의 바이오매스로 인한 그림자효과(mutual shading)의 영향으로 조사면의 반대편으로 저광도의 잔여 빛에너지로 방출되게 되며, 상기 저광도의 잔여 빛에너지는 유용산물 생산용 배양영역과 접



하고 다중 광생물반응기의 내부에 설치된 균체성장용 배양영역에 존재하는 광합성 미생물에 공급되어 균체성장을 위한 광합성 과정을 수행하게 된다.

- <40> 상기 빛에너지는 하기 수학식 1에 나타낸 바와 같이 비어-람버트 법칙(Beer-Lambert's Law)에 따라 광원에서 멀어질수록( $d$  증가) 그리고 배양액 내부의 균체농도가 증가할수록( $\rho$  증가) 지수적으로 감소하게 된다.
- <41> 【수학식 1】  $I = I_0 \exp(-\delta \rho d)$
- <42> (상기식에서,  $I$ 는 투과된 빛의 세기,  $I_0$ 는 광원의 세기,  $\delta$ 는 흡수계수,  $\rho$ 는 균체의 농도,  $d$ 는 균체가 존재하는 흡수층의 두께를 나타낸 것이다.)
- <43> 이때, 유용산물 생산용 배양영역을 투과하면서 초래되는 빛에너지 감소량은 광원의 광도( $I_0$ ), 유도영역에 존재하는 바이오매스의 농도( $\rho$ ), 균체의 크기 및 색소함량, 빛 투과거리(light penetrating depth;  $d$ ) 등에 영향을 받게 된다. 이에, 배양시 균체성장용 배양영역으로 공급되는 빛에너지 공급량을 균체의 성장에 적절한 수준이 되도록 유지해야 한다. 배양시 빛에너지 공급량이 너무 적으면 유용산물 배양영역내에서 유용산물을 축적할 수 없으며, 반대로 빛에너지 공급량이 너무 많으면 균체성장용 배양영역에서 균체성장이 저해될 뿐만 아니라 광합성에 사용되지 않은 빛에너지가 열에너지로 전환되어 배양액의 온도를 상승시키게 된다.
- <44> 본 발명의 다중 광생물반응기에서 배양을 위해 조사되는 광원으로는 태양광이 대표적이다. 이때 태양광이 유용산물 배양영역을 통과한 후 상기 투명분리장치를 거쳐 상기 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 유용산물 배양영역을 반응기내의 외측에 형성시키며, 상기 균체성장용 배양영역을 반응기내의 내측에 형성시킨다.

<45> 본 발명은 광원으로써 태양광 뿐만 아니라, 인공광원인 광조사장치를 포함한다. 이때 광조사장치를 통해 조사되는 광이 유용산물 배양영역을 통과한 후 투명분리장치를 거쳐 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 광조사장치가 유용산물 배양영역과 접하도록 형성시키고 균체성장용 배양영역과 접하지 않도록 형성시킨다. 적용가능한 광원으로는 형광램프, 할로젠 램프, 광섬유, 네온관 및 발광다이오드 소자 등 광합성에 적합한 빛(PAR: Photosynthetically Active Radiation)을 발하는 광원 중에서 선택된 한 개 이상의 것을 사용할 수 있다. 또한, 상기 광원들의 운전은 한 종류의 광원을 사용하거나 두 종류 이상의 광원을 복합적으로 활용할 수 있으며, 태양광을 빛에너지 공급원으로 기본적으로 이용하고, 계절적(겨울), 시간적(야간), 기상적(흐린 날) 요인 및 균체 성장과 효과적인 대사산물의 축적에 따라 모자라는 빛에너지를 추가 광원을 이용하여 불충분한 빛에너지를 공급하는 방법도 가능하다. 구체적으로 도 6, 도 7과 도 10에서 보는 바와 같이, 상기 광생물반응기의 최외측과 최내측에는 유용산물 배양영역이 형성되어 태양광이 상기 최외측의 유용산물 배양영역에 조사되고 광조사장치가 상기 최내측의 유용산물 배양영역에 조사되도록 한다.

<46> 또한, 상기 광조사장치는 개별적인 장치로 구비하는데, 이는 상기 장치가 단선 등의 문제 발생시 전체 광도에 영향을 주지 않게 하기 위한 것이다.

<47> 이러한 광원을 활용하는데 있어서, 빛에너지 공급량 및 파장, 빛에너지 공급시간 및 주기를 본 발명의 다중 광생물반응기내에 설치된 균체성장용 배양영역의 균체성장에 적합하거나, 유용산물 생산영역의 유용산물 생산에 적합하도록 조절할 수 있으며, 본 발명에서는 이에 대해 한정하지 않는다.

- 48> 본 발명의 광생물반응기는 여러 가지 형태로 제작할 수 있으며, 구체적으로 직육면체의 평면판, 원통형, 튜브형 및 입체형으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태로 제작할 수 있다.
- 49> 또한, 광생물반응기는 산업적인 활용을 위해서 배양용량의 증가(scale-up)가 필수적인데, 이를 위하여 각각의 다중 광생물반응기를 단위장치(unit module)로 활용하여 이를 연속적으로 설치(stack)할 수 있다. 이와 같은 복합 광생물반응기는 필요에 따라 평면판 형태의 광생물반응기와 광원을 샌드위치(sandwich) 형식의 1차원적인 다중배열이 가능하며, 수직원통 형태의 광생물반응기와 광원은 2차원적으로 배열하는 것이 가능하며, 또한 기타 가능한 3차원적인 배열이 가능하며, 전체 규모는 생물공정 규모와 공장 부지를 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 또한 설치된 단위 광생물반응기와 광원을 제거하거나 중간연결 파이프라인을 차단하는 방법으로 배양용량을 손쉽게 감소(scale-down)시킬 수 있다.
- <50> 한편, 균체성장용 배양영역과 유용산물 생산용 배양영역의 하단부에서 기체를 상향 공급함으로써 탄소원으로서의 이산화탄소( $\text{CO}_2$ )의 공급과 공급배양액의 상향유동을 야기할 수 있으며, 이를 위하여 공기부양(air-lift) 방식과 여기에 기계적 교반(impeller, magnetic stirrer 등)을 추가한 터빈(stirred-tank) 방식 등이 사용될 수 있다.
- <51> 또한 하절기에는 광원에서 유래된 열, 높은 외부온도. 균체 대사열 및 균체로 흡수되지 않는 빛에너지가 열에너지로 전환되면서 배양액의 온도가 증가하며, 반대로 동절기나 야간에는 적정 온도 이하로 배양온도가 떨어지면서 균체 성장 및 유용산물의 생산을 저해하게 된다. 따라서 광합성 미생물 성장 및 유용산물의 생산에 최적인 상태로 배양액의 온도를 유지할 필요가

있는 경우에는 냉각수 또는 온수를 열교환기 및 분무기(sprayer)를 설치하거나, 차양막(sun screen) 등을 사용하여 배양온도를 조절할 수 있다.

<52> 이하, 첨부된 도면을 참조로 본 발명의 바람직한 실시형태를 설명한다.

<53> 제 1실시형태로, 태양광을 사용한 경우의 광생물반응기이다.

<54> 도 1a 및 도 1b는 외부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 평면판(flat plate)의 양쪽 측면으로 빛에너지(3)가 공급되며, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 반응기 내부에 설치되고 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)으로 구성된 본 발명의 한 형태인 외부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<55> 도 2a 및 도 2b는 외부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 수직 원통형(cylinder)의 외부표면으로 빛에너지(3)가 공급되고, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)에 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 외부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<56> 도 3a 및 도 3b는 태양광을 이용한 관형(tubular) 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 옥외 배양시 태양광을 빛에너지(3)로 이용하고, 태양광이 직접적으로 조사되는 반응기 내부영역에서는 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고,

상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 관형(tubular) 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<57> 도 4a 및 도 4b는 내부 조사형 이중 평면판 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 평면판의 중앙에 설치된 빛에너지(3) 공급장치를 중심으로 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 내부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<58> 도 5a 및 도 5b는 도 4의 이중 평면판 형태의 다중 광생물반응기를 단위장치(unit module)로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 도면내에 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하고 있다.

<59> 도 6a 및 도 6b는 도 1 및 도 4의 복합 형태인 외·내부 조사형 삼중 평면판(triple flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 평면판의 양쪽 측면과 반응기의 중앙에서 빛에너지(3)가 공급되고, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 외·내부 조사형 삼중 평면판(triple flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

- <60> 도 7a 및 도 7b는 도 6의 외·내부 조사형 삼중 평면판 형태의 다중 광생물반응기를 단위 장치로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 도면내에 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하고 있다.
- <61> 도 8a 및 도 8b는 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 수직 원통형의 중앙에 설치된 빛에너지(3) 공급장치를 중심으로 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)에 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 내부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.
- <62> 도 9a 및 도 9b는 상기 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 광생물반응기를 단위장치로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하였다.
- <63> 도 10a 및 도 10b는 외·내부 조사형 삼중 수직원통 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 수직 원통형의 외부와 반응기의 중앙에서 빛에너지(3)가 공급되고, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 외·내부 조사형 삼중 수직원통(triple cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.
- <64> 도 11a 및 도 11b는 상기 삼중 수직원통 형태의 광생물반응기를 단위장치로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하였다.

- <65> 또한, 본 발명은 상기 다중 광생물반응기를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법에 있어서, 보다 상세하게 회분식(batch), 연속식(continuous) 및 유가식(fed-batch) 배양방법을 제공하고자 하나, 본 발명의 배양방법에 대한 이해를 돕기 위한 것에 불과하며 본 발명이 이에 한정된 것은 아니다.
- <66> 구체적으로, 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 회분식 배양방법에 있어서, 광합성 미생물을 광생물반응기의 균체성장용 배양영역 및 유용산물 생산영역에 주입하는 단계(회분배양 1 단계),
- <67> 상기 유용산물 생산영역을 향해 빛을 조사하여 광합성 미생물을 배양하여 유용산물 축적량을 최대화하는 단계(회분배양 2 단계), 및
- <68> 상기 배양 후 유용산물 생산영역과 균체성장 영역의 광합성 미생물을 수확하는 단계(회분배양 3 단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법을 제공한다.
- <69> 회분배양 1 단계에서는 본 발명의 광생물반응기 내부의 각 배양영역에 광합성 미생물을 주입한다. 본 발명의 광생물반응기를 이용하여 배양할 때, 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역에는 동일한 농도를 접종할 수 있고, 필요에 따라서 서로 다른 농도로 접종하거나 또한 이미 각 광도에 적응된 광합성 미생물을 이용하여 접종할 수도 있다. 이는 균체성장 배양 조건하에서 두 영역 모두에 주입된 광합성 미생물을 균체성장시키기 위한 것이다. 이때, 최초 주입 농도는 공급하는 빛의 양이 세포의 크기에 따라 상호그늘(mutual shading)이 생기지 않

는 농도로 주입해야 한다. 일예로, 클로렐라(*Chlorella*)의 경우,  $10^3 \sim 10^8$  cell/ml의 농도로 주입하고, 해마토코쿠스(*Haematococcus*)의 경우,  $10^3 \sim 10^7$  cell/ml의 농도로 주입한다. 이때 배지의 경우, 광합성 미생물에 따라 선택하여 사용할 수 있다.

<70> 회분배양 2 단계에서는 균체성장 및 유용산물 생산을 진행하기 위하여 상기 유용산물 배양영역을 향해 빛을 조사한다. 이때, 최초 빛의 광도는 광생물 미생물의 균체성장(optimal condition)에 맞도록 조절한다. 이는 최초 주입한 광합성 미생물을 균체성장 시키기 위한 것으로, 일예로, 해마토코쿠스의 경우 유용산물 생산영역의 표면광도가  $40 \sim 200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준이 되도록 빛의 광도를 조절하며, 이때 유용산물 생산영역을 투과한 후, 균체성장 영역에 도달한 빛의 광도는  $10 \sim 50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 감소한다. 그외 pH, 온도 및 가스 주입량은 광합성 미생물에 따라 조절할 수 있으며, 일예로, 해마토코쿠스를 사용할 경우, pH 7.0, 온도  $25^\circ\text{C}$  그리고 가스 주입량은  $100 \text{ ml}/\text{min}$ 으로 95 %의 공기에 5 %의 이산화탄소를 포함한 가스를 사용할 수 있다.

<71> 상기 광도로 일정시간 동안 조사하면, 유용산물 생산영역 내의 광합성 미생물의 균체 성장을 멈추는 정지기가 도래하며, 이때 광합성 미생물은 이차대사산물을 축적한다. 이러한 정지기는 배양영역 내에 주입한 광합성 미생물의 농도, 최초 조사된 광도 및 광합성 미생물의 종류에 따라 차이가 있으며, 하기 실시예의 조건하에서는 10일의 정지기를 확인하였으며, 아스타잔틴의 축적량은  $20 \sim 360 \text{ mg}/\text{L}$ 로 증가하였다(도 13c 및 도 13d 참조).

<72> 이러한 정지기 이후 광도를 유용산물 생산조건(stressed condition)을 조절하여 조사하는데, 상기 균체성장 배양 조건에 비해 고광도로 조사하게 된다. 상기 유용산물 생산조건의



광도는 광합성 미생물의 종류에 따라 다양하게 조절할 수 있는데, 일예로 해마토코쿠스의 경우, 아스타잔틴 생산영역으로 조사되는 빛에너지의 표면광도는 균체농도에 따라  $200 \sim 2,000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 조절한다. 이때부터 각 배양영역에 따라 구별되어 배양하게 되는데, 구체적으로, 고광도의 빛에너지를 조사받게 되는 유용산물 배양영역 내의 광합성 미생물은 고농도의 유용산물을 축적하게 되며, 빛에너지는 상기 영역을 통과하면서 감소되어 균체성장 배양영역에 조사될 때에는 이에 적합한 광도를 갖게 되며, 일예로 해마토코쿠스의 경우 균체성장 영역의 표면광도가  $10 \sim 100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 감소하게 되고, 이를 이용하여 균체를 성장시키게 된다. 첨부된 도 14a 및 도 14b에는 이러한 결과를 나타내는 그래프를 볼 수 있다. 상술한 바와 같이, 광생물반응기로의 빛에너지 공급은 광합성 미생물의 유도에 적합하도록 높은 광도로 조사하여 유용산물을 우선적으로 생산○축적하도록 유도하고, 이때 소모되지 않고 방출하는 빛에너지를 균체성장을 위하여 사용함으로써 광생물반응기에 공급되는 빛에너지의 효율을 극대화할 수 있다.

<73> 회분배양 3 단계에서는 유용산물 축적량이 최대에 도달한 후 유용산물 생산영역의 균체를 수확하여 균체로부터 유용산물을 분리, 정제, 농축하는 공정(downstream process)으로 진행한다. 동시에 균체성장용 배양영역의 균체는 다음번 회분식 배양의 접종용으로 활용하게 된다.

<74> 다음으로, 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 회분식 배양방법으로는 배양과정에 있어 필요한 영양분을 일시적 또는 연속적으로 공급하는 과정을 포함하는 광합성 미생물의 배양 방법을 제공한다.

- <75> 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 연속식 배양방법에 있어서,
- <76> 상기 회분식 배양 후 균체 성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물을 유용산물 배양 영역으로 이동시킨 후, 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입하는 단계(연속배양 1 단계),
- <77> 상기 유용산물 생산영역을 향해 빛을 조사하여 광합성 미생물을 배양하고 유용산물을 축적하는 단계(연속배양 2 단계), 및
- <78> 상기 연속배양 2단계를 거친 후 유용산물 생산영역의 광합성 미생물을 수확하고, 상기 연속배양 1단계와 연속배양 2단계를 반복적으로 수행하는 단계(연속배양 3 단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법을 제공한다.
- <79> 연속배양 1 단계는 회분식 배양 후 회분배양 1단계와 같이 광생물반응기의 각 영역에 광합성 미생물을 주입한다. 구체적으로 유용산물을 축적한 유용산물 생산영역내의 광합성 미생물을 수확하며, 균체성장용 배양영역내의 광합성 미생물을 유용산물 생산영역으로 이동시킨다. 이후 균체배양에 사용될 새로운 광합성 미생물을 계대배양에서 수확하여 배지와 함께 균체성장용 배양영역내에 주입한다. 또한 균체성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물 중 일부를 남기고 유용산물 배양영역으로 이동시킨 후, 새로운 배지를 균체성장용 배양영역에 주입하여 새로운 배양을 실시하는 경우로 대체될 수 있다,
- <80> 이때, 광합성 미생물의 이동방법은 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하거나, 공기압력에 의해 밀어 올려주는 방법 등을 사용한다. 상기 연동펌프를 이용한 경우, 수축이 용이한 관을 통해서 성장용 배양영역에서 고농도로 성장한 균체를 포함한 유체를 유용산물 배양영역으로

밀어 넣는다. 또한 공기압력에 의해 밀어 올려주는 방법을 이용한 경우, 균체성장용 배양영역내의 세포와 배양액을 외부공기와 차단된 멸균상태에서 수확한 후 공기의 압력에 의해서 밀어 올려준다. 상기 기술된 방법으로 새로운 광합성 미생물을 주입한다. 이러한 방법에 의해 연속적으로 이동시킬 수 있는 장점이 있다.

<81> 연속배양 2 단계는 광합성 미생물의 이동 및 주입 후 유용산물 생산영역의 방향으로 빛을 조사한다. 이때, 빛의 광도는 회분배양 2단계와 마찬가지로 유용산물 배양을 위한 고광도(stressed condition)로 조사를 하며, 회분배양 2단계의 후반부의 광도와 동일한 광도로 조사하며, 동일한 효과를 얻을 수 있다.

<82> 연속배양 3단계에서는 광합성 미생물을 연속적으로 그리고 대량으로 생산하기 위하여, 상기 연속배양 1단계 및 2단계를 반복적으로 수행하기 위한 중간단계이다. 구체적으로는 펌프나 공기압력을 이용하여 균체 성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물을 유용산물 배양영역으로 이동시키고 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입 이동시키는 연속배양 1단계와, 고광도의 빛을 조사하여 유용산물을 축적과 균체배양이 동시에 이루어지는 연속배양 2단계를 반복적으로 수행함으로써, 유용산물을 축적한 광합성 미생물을 연속적이고 대량으로 얻을 수 있다.

<83> 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 유가식 배양방법에 있어서,

- <4>      상기 회분식 및 연속식 배양이 진행됨에 따라 영양성분이 고갈되는 경우, 광합성 미생물의 균체성장 및 유용산물의 생산에 적합한 농도를 유지하기 위하여 필요한 영양성분을 공급할 필요가 있다. 일 예로 해마토코쿠스의 배양의 경우에 질소원의 농도를 배양 초기농도로 유지하는 것이 균체 성장에 효과적임이 알려져 있으므로(*Enzyme Microbial Technol.*, 2003, 33:403-409), 균체성장 영역에서는 질소원의 유가식 배양을 수행할 필요가 있다.
- <85>      본 발명의 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 배양방법에 적용할 수 있는 광합성 미생물은 균체 성장과 유용 대사산물 생산의 최적 환경 상태가 차이를 나타내는 모든 광합성 미생물을 포함하며, 일 예로, 해마토코쿠스(*Haematococcus* sp.), 듀나리엘라(*Dunaliella* sp.), 클로로코쿰(*Chlorococcum* sp.), 클로렐라(*Chlorella* sp.), 아세타불라리아(*Acetabularia* sp.), 마이크로시스티스(*Microcystis* sp.), 노스톡(*Nostoc* sp.), 오실라토리아(*Oscillatoria* sp.) 등이 있다.
- <86>      이하에서는 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 보다 상세하게 예시하고자 한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것에 불과하며 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- <87> <실시예 1> 본 발명의 광합성 미생물의 배양
- <88>      실시예 1에서는 도 12a 및 도 12b에 나타난 하부 기체 주입형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였다. 구체적으로, 상기 다중 광생물반응기는

수직 원통형의 외부에 설치된 발광체(8)를 이용하여 빛에너지가 공급되고, 빛에너지가 직접적으로 조사되는 외부재킷 부분에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역의 내부코어(inner core) 부분에 균체 성장용 배양영역(2)이 설치된 형태로 제작하였다. 또한, 상기 기포탑 광생물반응기는 700 ml 용량의 외부재킷과 700 ml 용량의 내부코어로 설계하여 제작되었다.

<89> 이때 각각의 영역 하단부에는 폭기 장치를 설치하여 유용산물 생산용 배양영역을 위한 기체 공급 장치(5)와 균체성장용 배양영역을 위한 기체 공급 장치(6)로부터 가스를 상향 공급함으로써 배양액의 상향유동을 야기시키며, 빛에너지 공급을 위한 발광체로는 직관 형광램프(8)를 사용하고 있으며 안정기와 점멸스위치가 설치되었다.

<90> 광합성 미생물은 고부가 유용산물인 아스타잔틴(astaxanthin)을 생산하는 것으로 알려진 해마토코쿠스(*Haematococcus pluvialis* UTEX16) 균주를 배양하였고, 영양배지로는 MBBM(Modified Bold's Basal Medium)를 사용하였다.

<91> (회분배양 1 단계) 광합성 미생물의 주입

<92> 상기 기술된 광생물반응기에 구비된 외부재킷(유용산물 배양영역)과 내부코어(균체성장용 배양영역)에 각각  $1.2 \times 10^4$  cell/ml 수준으로 주입하였다.

<93> (회분배양 2 단계) 배양

<94> 직관 형광램프(8)를 이용하여 빛에너지를 공급함으로써 배양을 수행하였다. 이때, 최초 배양부터 10일 동안은 외부재킷의 표면광도를  $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 유지하였으며, 10일 이후 빛에너지를 증가시켜  $770 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 유지하였다.

<95> 배양시 유체의 흐름과 배양액의 혼합 및 탄소원의 공급을 위하여 5% CO<sub>2</sub> 기체를 공기와 혼합하여 주입하였고, 통기량은 외부재킷과 내부코어 모두 100 ml/min으로 조절하였다.

<96> (연속배양 1단계) 이동 및 재접종

<97> 상기 최초 배양일로부터 24일 이후에 배양을 마치고, 연동 펌프를 이용하여 유용산물 배양영역 및 균체성장용 배양영역의 광합성 미생물을 각각 추출 및 유용산물 배양영역으로 이동시킨 후 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입하였다.

<98> (연속배양 2단계) 배양

<99> 빛에너지 공급량을 표면광도가 770  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 조사하여 외부재킷에 존재하는 균체가 아스타잔틴을 축적할 수 있도록 유도(induction)하였고, 균체성장 영역(내부코어)은 외부 유용산물 생산 영역(외부재킷)을 투과한 빛에너지가 균체성장에 적합한 광도로 감소되어 균체가 지속적으로 성장할 수 있도록 하였다. 이외의 환경조건은 상기 (2)의 후반부에 기술된 고광도의 조사시 환경조건과 동일하게 유지하였다.

<100> <실험예 1>

<101> 본 발명의 회분배양 1단계 및 2에 의한 균체의 생체 중량 및 아스타잔틴의 총량을 측정하기 위하여 실험을 수행하였다.

<102> 구체적으로, 광생물반응기는 상기 실시예 1의 하부 기체 주입형 이중 수직원통 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였다(도 12a 및 도 12b 참조).

- 03> 광합성 미생물은 고부가 유용산물인 아스타잔틴(astaxanthin)을 생산하는 것으로 알려진 해마토코쿠스(*Haematococcus pluvialis* UTEX16) 균주를 배양하였고, 영양배지는 MBBM(Modified Bold's Basal Medium)를 사용하였다.
- 104> 반응기 외부재킷의 표면광도를  $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 를 유지하였고, 외부재킷과 내부코어를  $1.2 \times 10^4 \text{ cell}/\text{mL}$  수준으로 주입하여 배양을 시작하였다.
- 105> 이때 유체의 흐름과 배양액의 혼합 및 탄소원의 공급을 위하여 5%  $\text{CO}_2$  기체를 공기와 혼합하여 주입하였고, 통기량은 외부컬럼과 내부코어 모두  $100 \text{ mL}/\text{min}$ 으로 조절하였다.
- 106> 배양시간은 0~24일이며, 2일이 경과 후 균체의 생체 중량(fresh weight) 및 아스타잔틴(astaxanthin) 총량을 측정하였다. 이에 대한 결과는 도 12c 및 도 12d에 나타내었다. 이때, 화살표는 배양 10일이 지난 후 저광도에서 고광도로의 변화시점을 표시한 것이다.
- 107> 도 12c 및 도 12d에서 보는 바와 같이, 배양을 시작 후 외부재킷과 내부코어의 균체가 비슷한 수준으로 성장하다가, 배양 6일이 경과하면서 외부컬럼과 내부코어의 생체중량에 차이를 나타내기 시작하였다. 이와 같은 현상은 외부재킷의 균체가 고농도로 증가함에 따라 그림자 효과가 증가되어 내부코어에 존재하는 균체에 불충분한 빛에너지가 공급되면서 발생하는 현상이다.
- 108> 배양 10일의 시점부터 빛에너지 공급량을 표면광도가  $770 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준이 되도록 증가시키는 방법으로 외부재킷에 존재하는 균체가 아스타잔틴을 축적할 수 있도록 유도(induction)하였고, 내부코어 영역은 외부재킷 영역을 투과한 빛에너지가 균체성장에 적합한 광도로 감소되어 균체가 지속적으로 성장할 수 있도록 하였다. 이때 빛조건 이외의 환경조건은

내부코어의 균체가 최적성장을 할 수 있도록 고농도의 영양성분을 주기적으로 공급한 반면, 외부컬럼 영역으로는 영양성분이 고갈된 상태가 유지되도록 하였다. 그 결과 외부재킷과 내부코어에 존재하는 균체성장 및 아스타잔틴의 축적패턴이 도 12c와 도 12d에 나타낸 바와 같이 뚜렷한 차이를 나타냈으며, 최종적으로 외부재킷 영역의 균체는 효과적인 유용산물의 생산이 이루어져 아스타잔틴 총량이 332 mg/ℓ에 도달하였고, 이때 세포 크기는 평균 36.27  $\mu\text{m}$ 로 확대되고, 최대 세포농도  $5.8 \times 10^5$  cell/ml와 생체중량(fresh weight) 9.94 g/ℓ의 균체를 얻을 수 있었다. 동시에 내부코어 영역에서는 균체가 지속적으로 성장하여 최대 세포농도  $3.2 \times 10^5$  cell/ml 및 생체중량 6.1 g/ℓ에 도달한 반면 아스타잔틴의 축적량은 31 mg/ℓ로 유지되어, 유용산물의 생산이 억제된 상황에서 지속적인 균체성장이 가능함을 확인할 수 있다.

#### 109> <실험예 2>

110> 다른 형태의 광생물반응기를 이용한 균체성장 및 아스타잔틴의 총량을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

111> 실험예 2에서는 도 13a 및 도 13b에 나타낸 바와 같이, 기체 주입방법이 다른 상부 및 하부 기체 주입형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였다. 구체적으로 상기 광생물반응기는 본 발명의 한 실시예인 외부조사형 이중 수직원통 광생물반응기(double cylinder photobioreactor)를 나타낸 것으로, 도 12의 반응기의 경우와 마찬가지로 배양액을 담을 수 있는 반응기 내부영역은 유용산물 생산용 배양영역(1)에 해당하는 수직원통형의 외부재킷과 균체 성장용 배양영역(2)에 해당하는 내부코어로 구성되어 있다. 또한 수직원통형의 외부에 설치된 직관 형광램프(8)를 이용하여 빛에너지를 공급하고, 유용산물 생산용



배양영역(1)을 위한 가스 공급 장치(5)는 반응기 하부에 설치하여 가스공급으로 인한 밀도차를 이용하여 배양액 내의 균체를 혼합(mixing)하게 된다. 도 12에 나타낸 반응기와의 차이점은 내부코어영역을 위한 가스 공급 장치(6)가 도 12는 반응기의 하부에 설치된 반면, 도 13의 반응기는 반응기 상부에 설치된 직립 스테인레스관을 통하여 내부코어의 하단부에서 기체를 발생할 수 있도록 설치되어 있다는 점이다.

- 112> 이때 상기 기포탑 광생물반응기는 500 ml 용량의 외부재킷과 500 ml 용량의 내부코어로 설계하여 제작되었다.
- 113> 유용산물 생산용 배양영역(1)의 외부재킷은 기포탑 광생물반응기 기저에서 혼합가스(5 % CO<sub>2</sub>)를 주입한 반면, 균체 성장용 배양영역(1)의 내부코어는 반응기 상부에서 스테인리스 (stainless steel) 직립 가스 주입관을 통하여 내부코어 영역의 하부까지 연결되도록 설치하여 혼합가스를 주입하였다.
- 114> 균주 및 배지는 상기 실시예 1에서와 같은 해마토코쿠스 균주와 MBBM 배지를 사용하였다
- 115> 통기량은 외부컬럼과 내부코어 각각 100 ml/min으로 유지하는 방법으로 유가식 배양을 수행하였다.
- 116> 발광체는 외부발광체로 직관형광램프를 이용하였고, 배양초기 외부컬럼의 표면 광도는 80  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 을 유지하다가, 배양 10일째부터 770  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 광도를 증가시켜 외부 재킷과 내부코어 영역이 각각 유용산물 축적과 균체성장이 이루어지도록 하였다.
- 117> 배양시간은 0~24일이며, 2일이 경과 후 균체의 생체 중량(fresh weight) 및 아스타잔틴(astaxanthin) 총량을 측정하였다. 이에 대한 결과는 도 13c 및 도 13d에 나타내었

다. 상기 도면에서 화살표는 배양 10일에 저광도에서 고광도로의 광도의 변화가 일어나 시점을 표시한 것이다.

18> 도 13c 및 도 13d에서 보는 바와 같이, 배양 결과를 비교해 보면 외부재킷 영역에서 효과적인 유용산물 생산이 이루어져, 최종적으로 배양을 종료한 시점에서는 356 mg/l 수준의 아스타잔틴의 축적을 유도할 수 있었다. 이는 균체성장 영역에 해당하는 내부코어 영역의 아스타잔틴 축적량과 10배 이상의 높은 값에 해당하는 것으로, 이를 통하여 아스타잔틴 생산용 외부재킷 영역과 균체성장용 내부코어 영역으로 구성된 이중 광생물반응기를 실제 광합성 미생물의 배양에 적용이 가능함을 확인할 수 있었다.

#### 119> <실험예 3>

120> 본 발명의 연속배양 1단계를 가정하여 외부재킷 및 내부코어에 서로 다른 균체 농도의 접종을 통하여 균체 및 유용산물을 얻기 위해 실험을 실시하였다.

121> 실시예 3에서는 도 13a 및 도 13b에 나타난 바와 같이, 기체 주입방법이 다른 상부 및 하부 기체 주입형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였으며, 발광체는 광생물반응기의 외부에 구비 설치하였다. 이때 상기 기포탑 광생물반응기는 500 ml 용량의 외부재킷과 500 ml 용량의 내부코어로 설계하여 제작되었다.

122> 유용산물 생산용 배양영역(1)의 외부재킷은 기포탑 광생물반응기 기저에서 혼합가스(5 % CO<sub>2</sub>)를 주입한 반면, 균체 성장용 배양영역(1)의 내부코어는 반응기 상부에서 스테인리스

(stainless steel) 직립 가스 주입관을 통하여 내부코어 영역의 하부까지 연결되도록 설치하여 혼합가스를 주입하였다.

123> 균주 및 배지는 상기 실시예 1에서와 같은 해마토코쿠스 균주와 MBBM 배지를 사용하였다. 이때, 외부재킷에는 실시예 1 및 실시예 2의 내부코어에서 얻어진 균체를  $2.5 \times 10^5$  cell/ml의 수준으로 접종하였으며, 내부코어에는 새로운 균체를  $1.0 \times 10^5$  cell/ml의 수준으로 접종하였다.

124> 통기량은 외부컬럼과 내부코어 각각 100 ml/min으로 유지하는 방법으로 유가식 배양을 수행하였다.

125> 발광체는 외부발광체로 직관형광램프를 이용하였고, 배양초기 외부컬럼의 표면 광도는  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 를 유지하였다. 이때, 외부재킷내 균체로 인해 내부코어의 표면 광도는  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 를 유지하였다.

126> 배양시간은 0~16일이며, 1일이 경과 후 균체의 생체 중량(fresh weight) 및 아스타잔틴(astaxanthin) 총량을 측정하였다. 이에 대한 결과는 도 14a 및 도 14b에 나타내었다.

127> 도 14a는 배양시간의 경과에 따른 광생물반응기 내부의 유용산물 생산용 배양영역(1)과 균체 성장용 배양영역(2)의 생체중량의 변화를 나타낸 것이며, 도 14b는 각 영역의 아스타잔틴 축적량의 변화를 나타낸 것이다. 배양 결과를 비교해 보면 효과적인 유용산물 생산이 이루어져, 최종적으로 배양을 종료한 시점에서는  $368 \text{ mg}/\ell$  수준의 아스타잔틴의 축적을 유도할 수 있었고, 이는 균체성장 영역에 해당하는 내부코어 영역의 아스타잔틴 축적량과 24.5 배 이상의 높은 값에 해당한다. 동시에 내부코어 영역에서는 균체가 지속적으로 성장하여 최대 세포농도

3.5  $\times 10^5$  cell/ml 및 생체중량 3.01 g/l 에 도달한 반면 아스타잔틴의 축적량은 15 mg/l 로 유지되어, 유용산물의 생산이 억제된 상황에서 지속적인 균체성장이 가능하였다.

- 128> 본 발명의 생물공정을 통하여 외부재킷의 균체가 고농도의 유용산물을 축적하므로 이를 수확하고, 내부코어의 균체성장영역에서 배양한 균체를 다음번 배양시의 외부재킷의 고농도 접종에 활용하게 된다. 따라서 지속적으로 내부코어에는 새로이 균체를 접종하고, 외부재킷의 접종은 이전 배양에서 고농도로 성장한 내부코어의 균체를 활용이 가능하게 되어 기존의 2 단계 배양을 단일 반응기에서 구현할 수 있음을 확인할 수 있었다.

#### 【발명의 효과】

- 129> 상술한 바와 같이, 본 발명의 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법은 종래의 2단계 생물공정을 단일 반응기에서 구현한 것으로, 기존의 균체의 고농도 속성 배양 단계와 유용 대사산물의 생산단계로 구성된 2단계 생물공정을, 본 발명의 다중 광생물반응기의 내부영역을 균체성장 영역과 유용산물 생산영역으로 구분하여 설치하는 방법으로 공정을 단순화하였다. 이로 인하여 하나의 빛에너지를 이용하여 유용산물 배양 및 균체성장 배양을 동시에 수행할 수 있으며, 균체 성장을 위한 배양 및 생산물 유도에 필요한 노동력을 줄일 수 있고, 불필요한 2단계 과정의 생략함으로써 지대(land cost), 장치 설치비, 운전비의 비용 절감과 전력 소비량을 줄일 수 있고, 이를 통하여 유용산물의 생산공정의 경제성을 향상시킬 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역;

상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역; 및

상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 양 영역 사이에 형성된 투명분리장치를 포함하여 이루어지며,

배양을 위해 조사되는 태양광 또는 인공광이 상기 유용산물 배양영역을 통과한 후 상기 투명분리장치를 거쳐 상기 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 유용산물 배양영역은 반응기내의 광원 쪽에 형성되며, 상기 균체성장용 배양영역은 반응기내의 광원이 유용산물 배양영역을 통과하여 도달하는 쪽에 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기 및 상기 광생물반응기의 여러 단계 위의 공간적 배열에 의한 광생물반응기.

**【청구항 2】**

균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역;

상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역;

상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 그 사이에 형성된 투명분리장치; 및

광을 조사하기 위한 광조사장치를 포함하여 이루어지며,

상기 광조사장치를 통해 조사되는 광이 상기 유용산물 배양영역을 통과한 후 상기 투명 분리장치를 거쳐 상기 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 유용산물 배양영역은 상기 광조사장치와 접하도록 형성되고, 상기 균체성장용 배양영역은 상기 광조사장치와 접하지 않도록 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기 및 상기 광생물반응기의 여러 단위의 공간적 배열에 의한 광생물반응기.

### 【청구항 3】

제 2항에 있어서,

상기 광생물반응기의 최외측에는 유용산물 배양영역이 형성되어 태양광이 상기 최외측의 유용산물 배양영역에 조사되는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

### 【청구항 4】

제 2항 또는 제3항에 있어서,

상기 광조사장치는 형광램프, 할로젠 램프, 광섬유, 네온관, 발광 다이오드 소자로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 발광장치인 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

### 【청구항 5】

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 광조사장치는 개별적인 장치로 구비되는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 6】**

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 광생물반응기는 직육면체의 평면판, 원통형, 튜브형 및 입체모형으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태인 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 7】**

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 균체성장용 배양영역 및 유용산물 배양영역에 가스를 주입하기 위한 가스 주입 장치가 추가로 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 8】**

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 균체성장용 배양영역 및 유용산물 배양영역 내에 기계적 교반을 위한 임펠러 또는 자석 교반기가 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 9】**

제 1항, 제2항 또는 제6항에 있어서,

상기 광생물반응기는 1차원적, 2차원적 또는 3차원적으로 연속배열되어 있는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 10】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 광생물반응기를 회분식, 연속식 또는 유가식으로 운전하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물 배양방법.

**【청구항 11】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 광생물반응기는 온도변화장치 및 차양막을 구비하는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 12】**

제 11항에 있어서,

상기 온도변화장치는 열교환장치, 항온순환기 또는 분무장치인 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 13】**

광합성 미생물을 청구항 1 또는 2의 광생물반응기에 구비된 균체성장용 배양영역 및 유용산물 배양영역에 주입하는 단계(회분배양 1단계),

상기 유용산물 배양영역을 향해 빛을 조사하여 배양하는 단계(회분배양 2단계), 및



상기 배양 후 유용산물 생산영역과 균체성장 영역의 광합성 미생물을 수확하는 단계(회분배양 3단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법.

#### 【청구항 14】

광합성 미생물을 청구항 1 또는 2의 광생물반응기에 구비된 균체 성장용 배양영역에서 회분 배양 후 성장한 광합성 미생물을 유용산물 배양영역으로 이동시킨 후, 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입하는 단계(연속배양 1단계),

상기 유용산물 생산영역을 향해 빛을 조사하여 광합성 미생물을 배양하고 유용산물을 축적하는 단계(연속배양 2단계), 및

상기 배양 후 유용산물 생산영역의 광합성 미생물을 수확하고, 균체성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물의 전체 또는 일부를 유용산물 생산영역으로 이동하는 상기 1단계와 2단계를 반복적으로 수행하는 단계(연속배양 3단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법.

#### 【청구항 15】

광합성 미생물을 제 1항 또는 제 2항의 광생물반응기를 이용하여 배양을 진행함에 따라 고갈되는 영양성분을 선택적으로 균체성장영역 또는 유용산물 생산영역에 공급하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 16】**

제 13항 또는 제14항에 있어서,

상기 단계 2의 빛 조사를 최초 조사부터 광합성 미생물의 정지기까지 균체성장 배양조건(optimal condition)으로 조사한 후 정지기 이후 유용산물 배양조건(stressed condition)으로 조사하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 17】**

제 14항에 있어서,

상기 단계 3의 이동을 연동 펌프를 이용하거나, 공기의 압력을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 18】**

제 14항에 있어서,

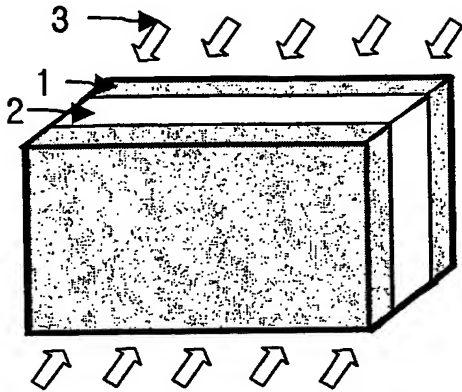
상기 단계 4의 조사 광도를 유용산물 배양조건(stressed condition)으로 조절하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 19】**

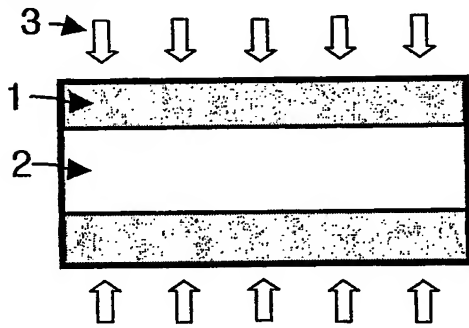
제 13항에 있어서, 상기 광합성 미생물이 해마토코쿠스, 듀나리엘라, 클로로코쿰, 클로렐라, 아세타블라리아, 마이크로시스티스, 노스톡 및 오실라토리아를 포함하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

【도면】

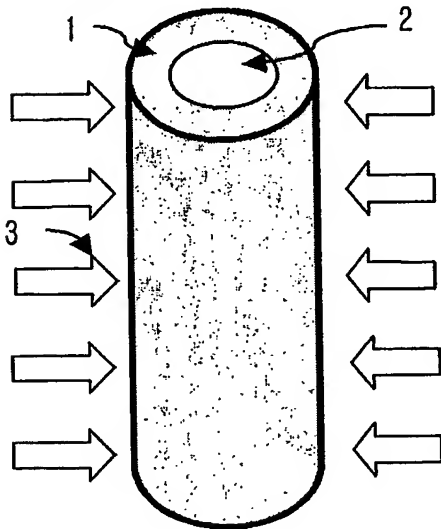
【도 1a】



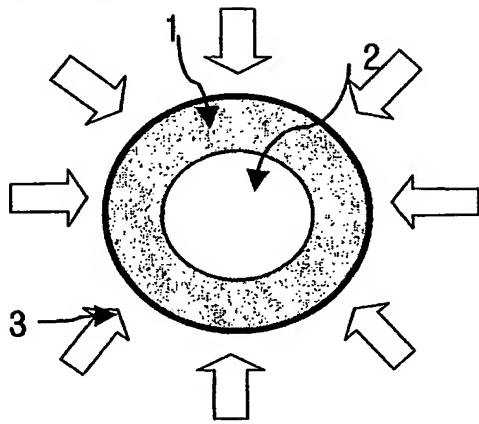
【도 1b】



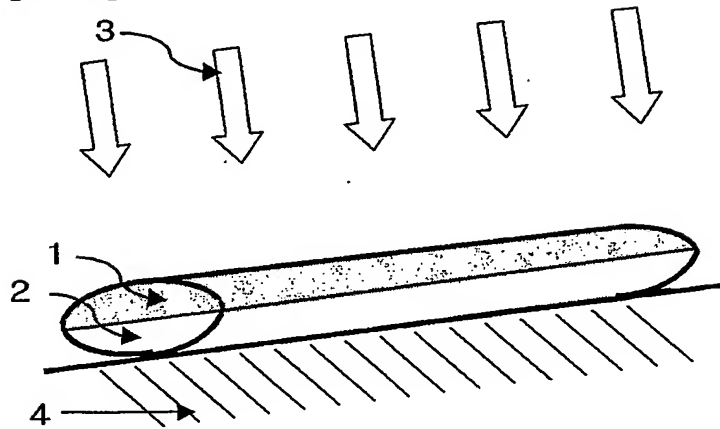
【도 2a】



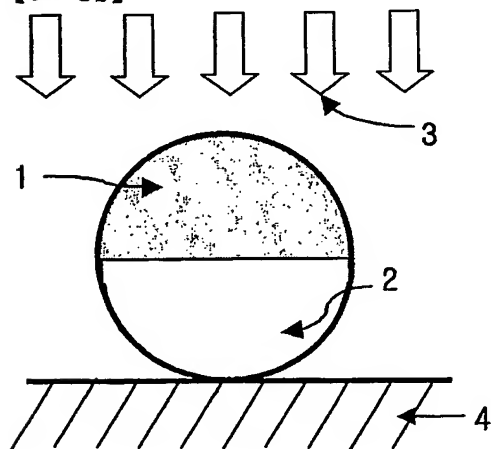
【도 2b】



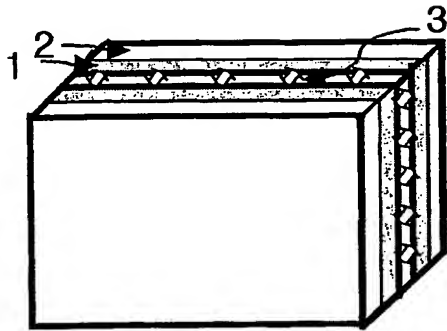
【도 3a】



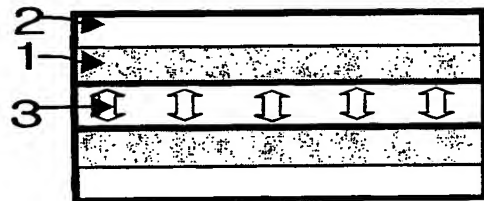
【도 3b】



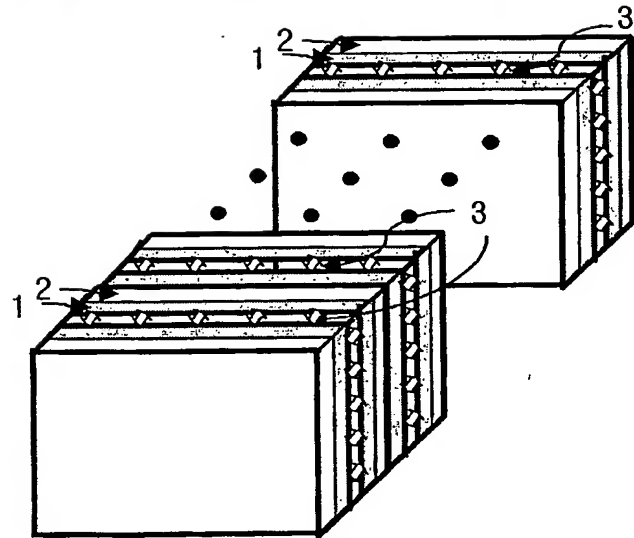
【도 4a】



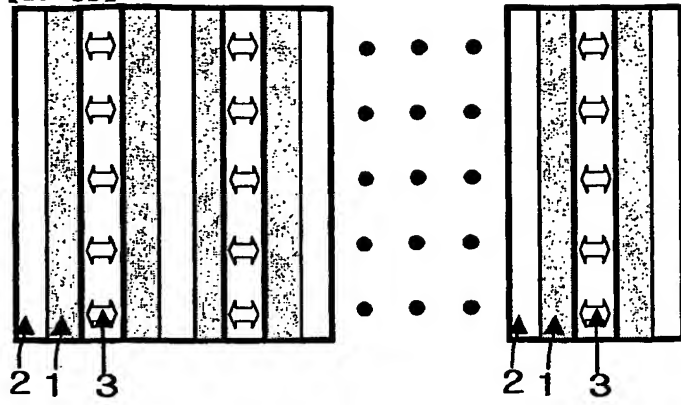
【도 4b】



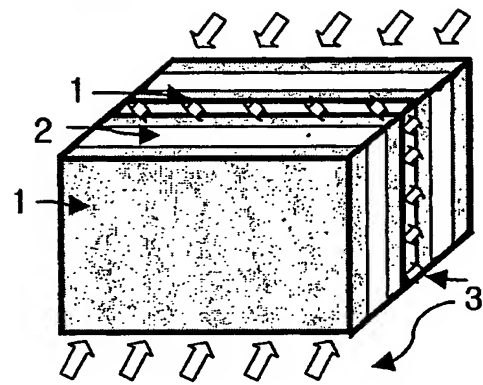
【도 5a】



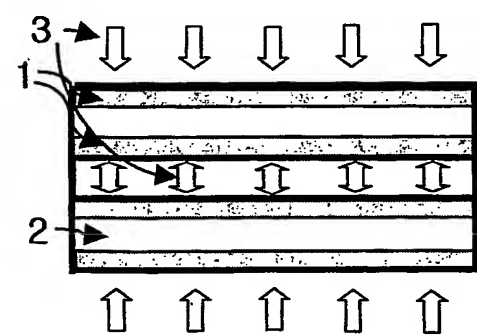
【도 5b】



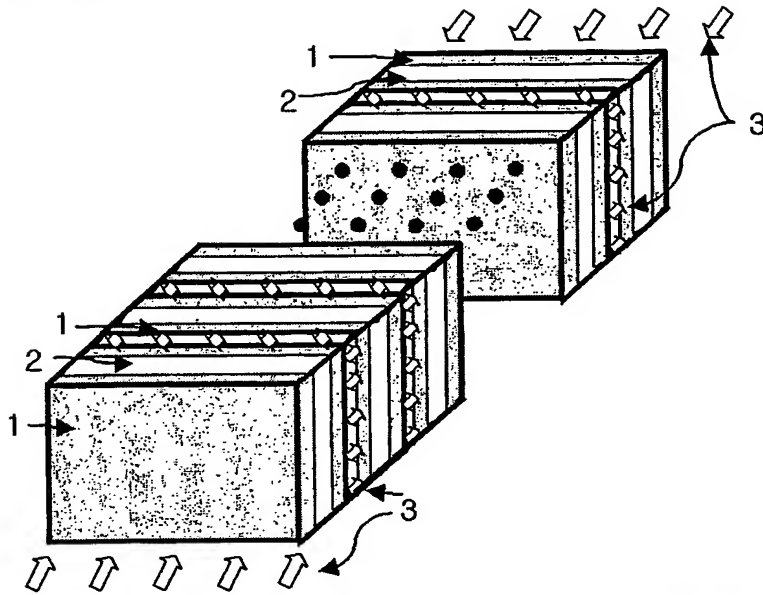
【도 6a】



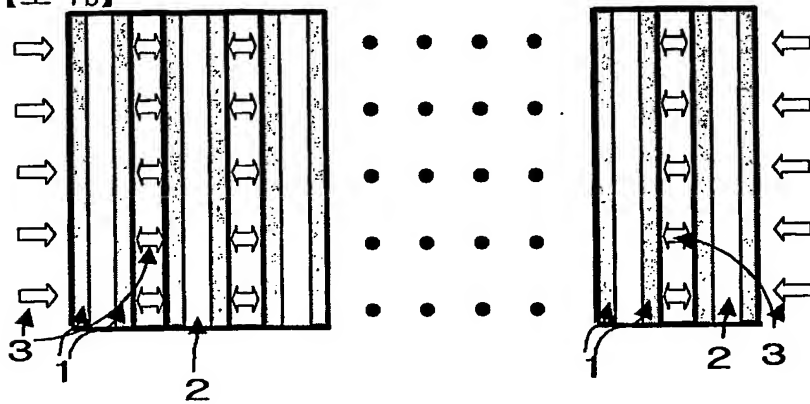
【도 6b】



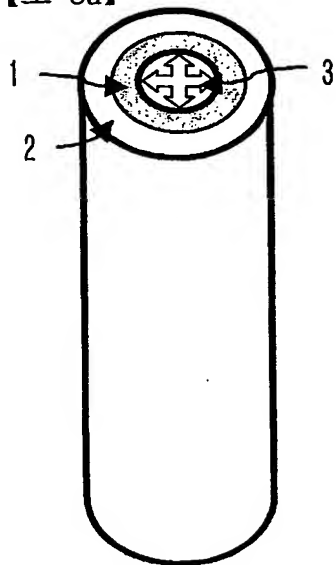
【도 7a】



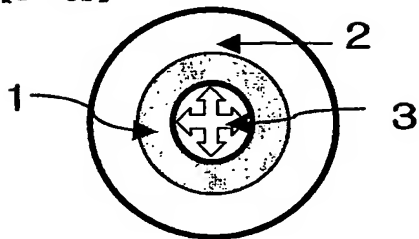
【도 7b】



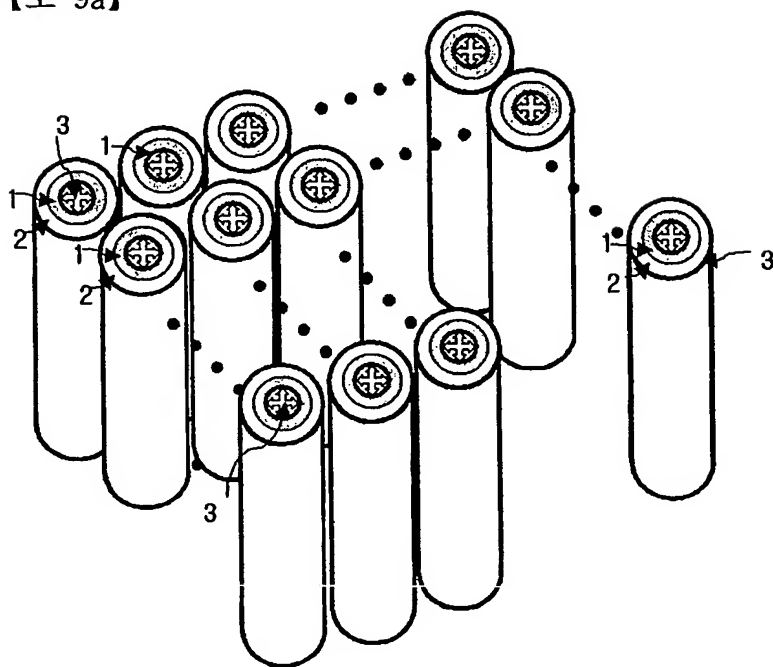
【도 8a】



【도 8b】

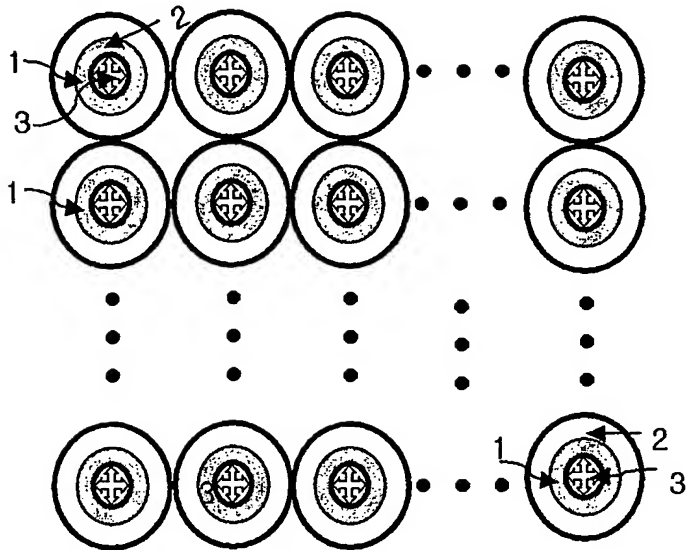


【도 9a】

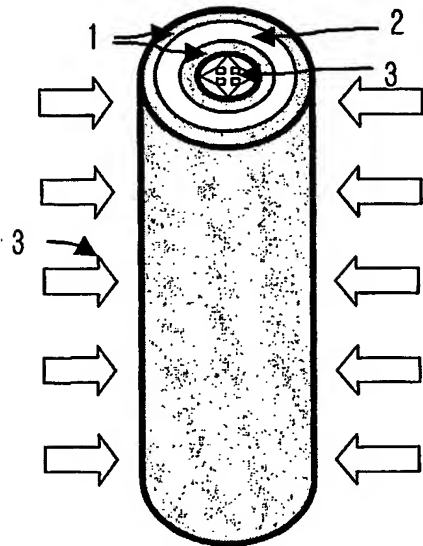




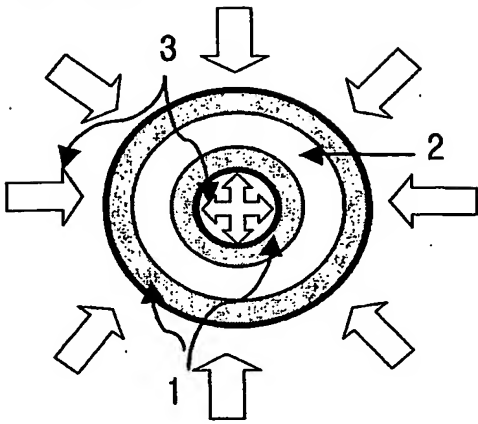
【도 9b】



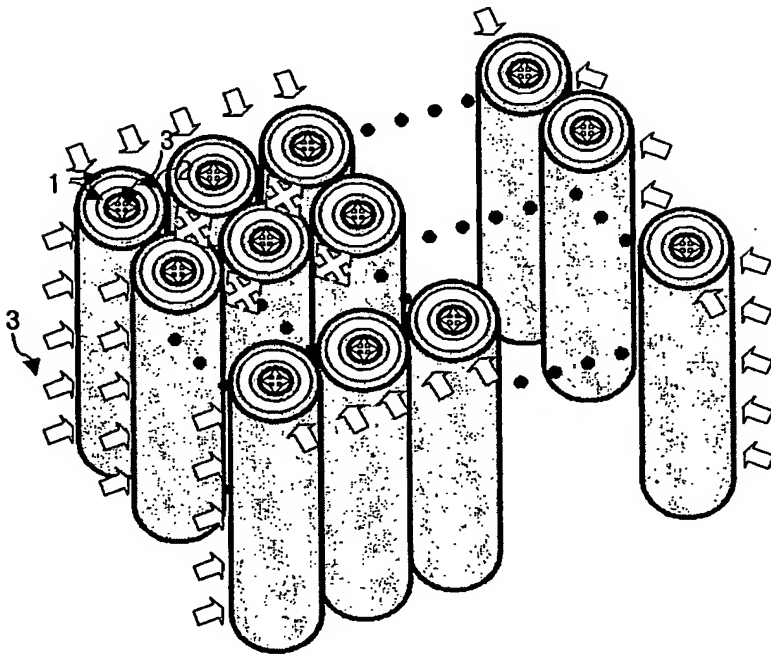
【도 10a】



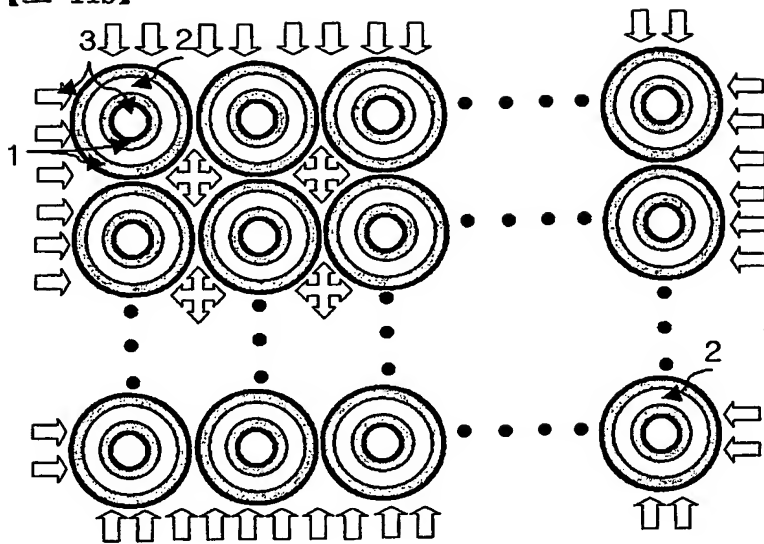
【도 10b】



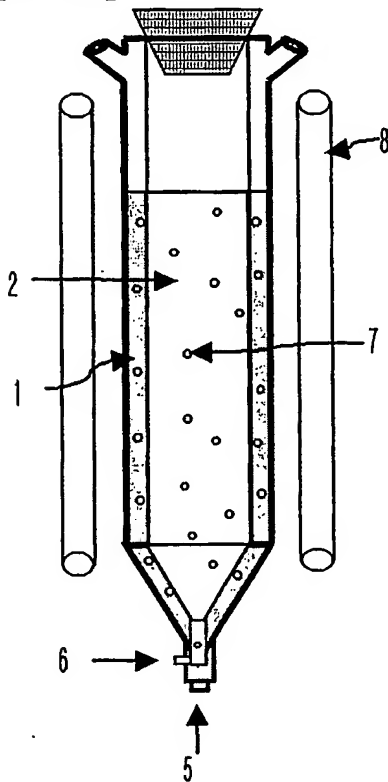
【도 11a】



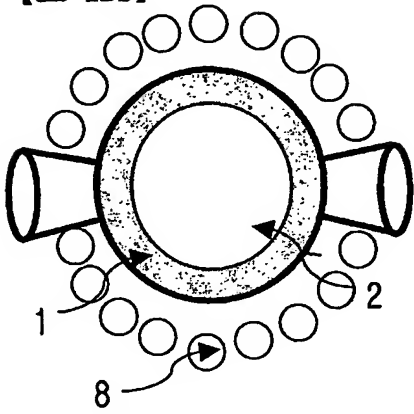
【도 11b】



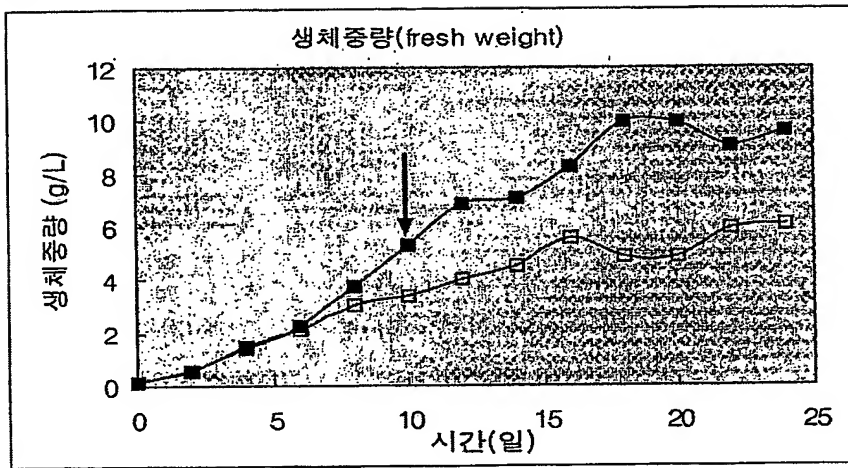
【도 12a】



【도 12b】



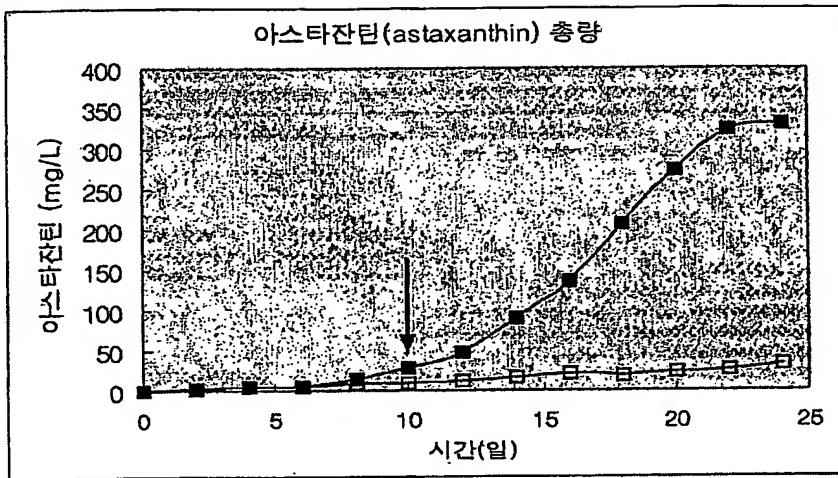
【도 12c】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

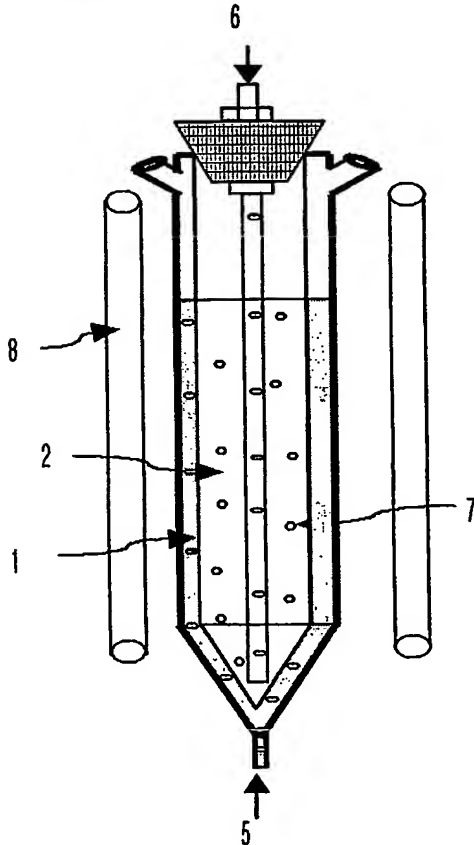
【도 12d】



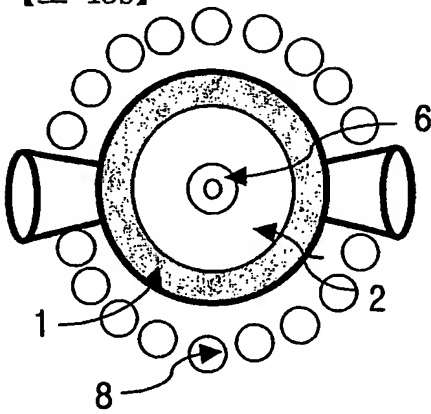
■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

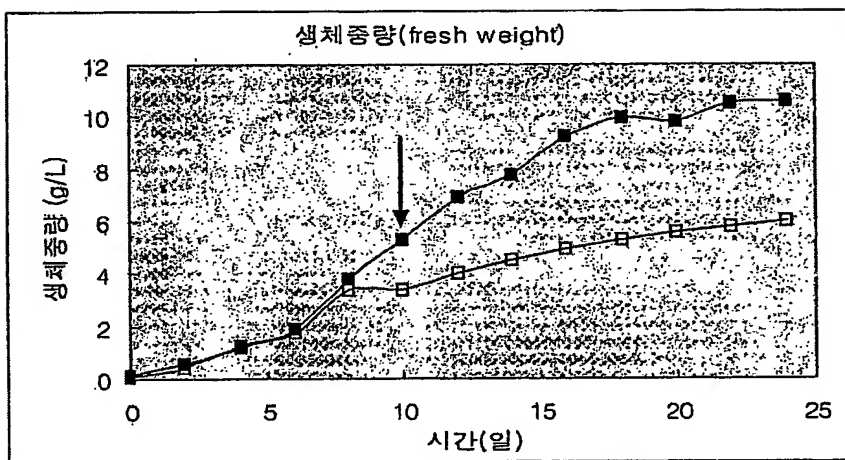
【도 13a】



【도 13b】



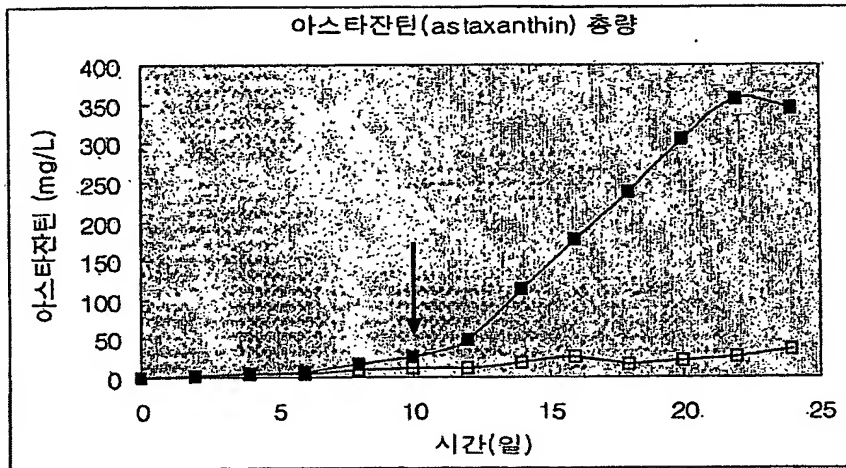
【도 13c】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

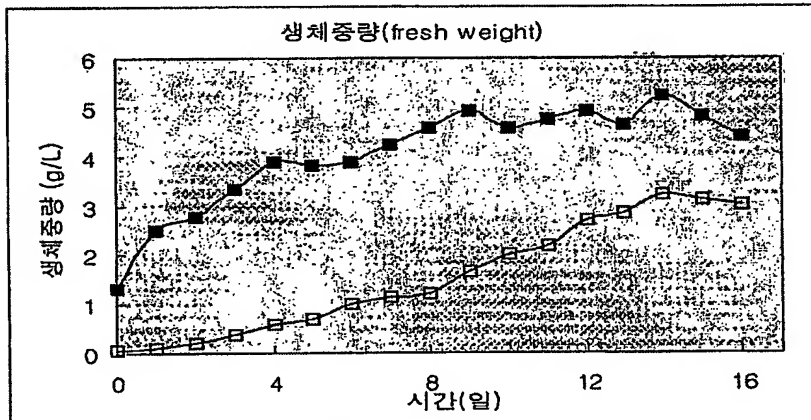
【도 13d】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

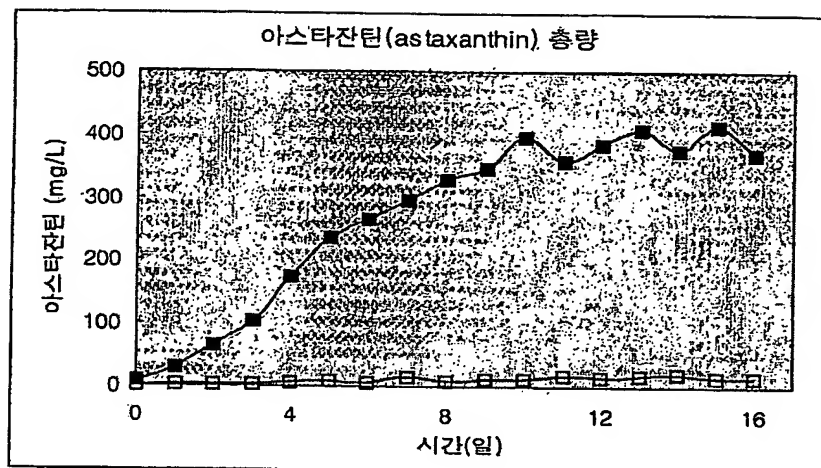
【도 14a】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

【도 14b】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)



페이지 : 1

접수일자 : 2004.02.16

신청인명 : 법인 인하학원

번호 : 5-1-2004-5011514-10

신청방법 : 직접(대전)

신청번호 : 특허-2003-0092086

| 접수번호             | 접수일자       | 서류명   | 포대위치   | 전자화상태 |
|------------------|------------|-------|--------|-------|
| -1-03-0480464-92 | 2003.12.16 | 특허출원서 | 심사총괄서버 | 검수완료  |

## 【서지사항】

|            |   |
|------------|---|
| 【서류명】      | 특허출원서   |
| 【권리구분】     | 특허  |
| 【수신처】      | 특허청장  |
| 【제출일자】     | 2003. 12. 16  |
| 【발명의 명칭】   | 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법   |
| 【발명의 영문명칭】 | MULTIPLE LAYER PHOTOBIOREACTORS AND METHOD FOR CULTURING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS USING THEM |
| 【출원인】      |   |
| 【명칭】       | 학교법인 인하학원   |
| 【출원인코드】    | 2-1998-097684-7   |
| 【대리인】      |   |
| 【성명】       | 이원희   |
| 【대리인코드】    | 9-1998-000385-9   |
| 【포괄위임등록번호】 | 2000-020536-1   |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 이철균   |
| 【성명의 영문표기】 | LEE, Choul-Gyun   |
| 【주민등록번호】   | 620501-1047818  |
| 【우편번호】     | 121-882   |
| 【주소】       | 서울특별시 마포구 창전동 437 삼성아파트 107동 1304호  |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 서인수   |
| 【성명의 영문표기】 | SUH, In Soo   |
| 【주민등록번호】   | 701110-1932317  |
| 【우편번호】     | 690-081   |
| 【주소】       | 제주도 제주시 도련1동 2253-1번지   |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 주현나   |
| 【성명의 영문표기】 | JOO, Hyun-Na  |
| 【주민등록번호】   | 800801-2330927  |

【우편번호】 232-949

【주소】 강원도 평창군 진부면 하진부 8리 1반 177번지

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
이원희 (인)

【수수료】

|           |      |                   |
|-----------|------|-------------------|
| 【기본출원료】   | 20 면 | 29,000 원          |
| 【가산출원료】   | 35 면 | 35,000 원          |
| 【우선권주장료】  | 0 건  | 0 원               |
| 【심사청구료】   | 19 항 | 717,000 원         |
| 【합계】      |      | 781,000 원         |
| 【감면사유】    |      | 학교                |
| 【감면후 수수료】 |      | 390,500 원         |
| 【첨부서류】    |      | 1. 요약서·명세서(도면)_1통 |

## 【요약서】

## 【요약】

본 발명은 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법에 관한 것으로, 구체적으로 균체 및 배양액을 담을 수 있는 한 개 이상의 균체성장용 배양영역; 및 상기 균체 성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 유용산물을 생산할 수 있는 균체 및 배양액을 담을 수 있는 한 개 이상의 유용산물 생산용 배양영역으로 이루어진 것으로, 상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 생산용 배양영역은 투명판으로 이루어진 분리장치를 이용하여 분리되고, 유용물질의 생산을 유도하기에 충분히 강한 빛이 유용산물 생산용 배양영역을 조사한 후, 상기 영역을 통과하는 과정에서 세포의 성장에 적절한 광도로 낮아진 빛이 균체성장용 배양영역에 도달하도록 설치된 것을 특징으로 하는 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법에 관한 것이다.

본 발명의 다중 광생물반응기는 균체 성장과 유용 대사산물 생산의 최적 환경 상태가 뚜렷한 차이를 나타내는 광합성 미생물을 배양시킬 수 있는 것으로, 먼저 태양광 또는 인공광원의 빛에너지를 유용산물 생산용 배양영역의 방향으로 공급함으로써 균체내 유용 대사산물을 축적시킨다. 이때 균체성장용 배양영역으로 공급되는 빛에너지는 유용산물 생산용 배양영역내 균체 자체로 인한 그림자 효과로 인하여 균체 성장에 적합한 광도로 감소하게 되며, 이렇게 감소된 빛에너지를 균체성장용 배양영역에 공급함으로써 균체를 성장시킬 수 있게 된다.

이러한 장치를 이용한 광합성 미생물의 배양방법은 종래 균체성장용 배양조와 유용산물 생산용 배양조를 각각 설치하여 수행하던 배양을, 1개의 배양조에서 조절된 빛의 조사에 의해 균체성장과 유용산물 생산을 위한 배양을 동시에 수행할 수 있어 균체의 고농도 속성배양과 효

과적인 유용산물 생산이 동시에 가능하게 되어, 상대적으로 적은 공간에서 적은 노력으로, 상대적으로 높은 에너지 효율로 유용물질을 생산할 수 있다.

**【대표도】**

도 1a

**【색인어】**

광생물반응기, 유용산물, 광합성 미생물, 균체성장, 배양방법.

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물 배양방법{MULTIPLE LAYER  
PHOTOBIOREACTORS AND METHOD FOR CULTURING PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS USING THEM}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1a 및 도 1b는 외부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 2a 및 도 2b는 외부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 3a 및 도 3b는 태양광을 이용한 관형(tubular) 광생물반응기의 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 4a 및 도 4b는 내부 조사형 이중 평면판 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 5a 및 도 5b는 도 4의 내부 조사형 이중 평면판 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 6a 및 도 6b는 외○내부 조사형 삼중 평면판(triple flat-plate) 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 7a 및 도 7b는 도 6의 외○내부 조사형 삼중 평면판 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 8a 및 도 8b는 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 광생물반응기 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 9a 및 도 9b는 도 8의 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 10a 및 도 10b는 외○내부 조사형 삼중 수직원통(triple cylinder) 형태의 광생물반응기의 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 11a 및 도 11b는 도 10의 외○내부 조사형 삼중 수직원통 형태의 광생물반응기가 연속적으로 배열된 구조를 개략적으로 나타내는 측면도 및 단면도이며,

도 12a 및 도 12b는 하부 기체 주입형 이중 수직원통 형태의 기포탑 광생물반응기에 외부 발광체가 구비된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 12c는 도 12a의 광생물반응기를 이용한 실시예 1의 배양시간의 경과에 따른 생체중량의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 12d는 도 12a의 광생물반응기를 이용한 실시예 1의 배양시간의 경과에 따른 아스타잔틴(astaxanthin) 양의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 13a 및 도 13b는 기체 주입방법이 다른 상부 및 하부 기체 주입형 이중 수직원통 형태의 기포탑 광생물반응기에 외부 발광체가 구비된 구조를 개략적으로 나타낸 측면도 및 단면도이며,

도 13c는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 2의 배양시간의 경과에 따른 생체중량의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 13d는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 2의 배양시간의 경과에 따른 아스타잔틴 양의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 14a는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 3의 배양시간의 경과에 따른 생체중량의 변화를 나타낸 그래프이며,

도 14b는 도 13a의 광생물반응기를 이용한 실시예 3의 배양시간의 경과에 따른 아스타잔틴 양의 변화를 나타낸 그래프이다.

#### <도면의 주요부분에 대한 부호의 설명>

- 1 : 유용산물 생산용 배양영역    2 : 균체성장용 배양영역
- 3 : 빛에너지    4 : 지면
- 5 : 유용산물 생산용 배양영역의 가스 주입구
- 6 : 균체성장용 배양영역의 가스 주입구
- 7 : 기포    8 : 직관 형광램프

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<26> 본 발명은 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법에 관한 것으로, 구체적으로 균체 성장과 유용 대사산물 생산의 최적 환경 상태가 뚜렷한 차이를 나타내는 광합성 미생물을 배양하기 위한 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법에 관한 것이다.



27> 최근 국내외적으로 생명공학의 새로운 개척분야로서 조류 생물공학(algal biotechnology)에 대한 관심이 높아지고 있다. 상기 조류 생물공학은 여러 광합성 미생물로부터 다양한 고부가가치의 유용산물을 발견 및 분리하는 것으로, 이러한 광합성 미생물로부터 얻어진 유용산물은 고부가가치의 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강식품; 카로테노이드(carotenoids), 빌리프로테인(biliprotein) 등의 염료; 바이오플로쿨런트(bioflocculant), 폴리올(polyols), 탄수화물 등의 정제 화학약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료로 활용되고 있다.

<28> 이러한 광합성 미생물 중에는 균체성장과 유용산물 생산이 서로 다른 환경조건을 요구하는 것이 특징으로 하는 종들이 알려져 있으며, 이들 광합성 미생물로부터 유용산물을 얻기 위하여 일반적으로 두 단계로 구성된 공정을 수행하고 있다. 첫 번째 단계에서는 균체성장에 적합한 배양조건(optimal growth condition)을 유지하여 균체를 성장시키며, 두 번째 단계에서는 이렇게 성장된 균체로부터 유용산물을 얻기 위해 적합한 배양조건(stressed condition)을 유지하여 균체가 더 이상 성장하지 않는 정지기(stationary phase) 기간 동안 유용산물을 생산한다. 이렇게 얻어진 유용산물은 균체성장과 무관하게 생성되는 관계로 2차 대사산물(secondary metabolite) 또는 비생장관련산물(nongrowth-associated product)이라고 한다.

<29> 이러한 특징을 갖는 광합성 미생물에는 해마토코쿠스(*Haematococcus* sp.), 듀나리엘라(*Dunaliella* sp.), 클로로코쿰(*Chlorococcum* sp.), 클로렐라(*Chlorella* sp.), 아세타블라리아(*Acetabularia* sp.), 마이크로시스티스(*Microcystis* sp.), 노스톡(*Nostoc* sp.), 오실라토리아(*Osillatoria* sp.)

*Oscillatoria* sp.) 등이 있다. 그 중 특히 해마토코쿠스는 항산화제로 유용하게 사용되고 있는 아스타잔틴(astaxantin)을 유용산물로서 생산할 수 있다.

- <30> 이러한 것을 기초로 하여 종래 광합성 미생물을 이용한 고부가 유용산물의 생산방법은 균체성장용 배양조와 유용산물 생산용 배양조를 각각 설치한 2 단계 생물공정으로 이루어져 있다. 구체적으로, 단계 1 공정에서는 균체성장용 배양조에서 균체 성장에 적합한 성장조건(optimal growth condition)을 유지하는 방법으로 균체의 고농도 속성배양을 구현하고, 단계 2 공정에서는 유용산물 생산용 배양조에서 적정 환경조건을 유지하여 상기 단계 1 공정에서 확보된 바이오매스(biomass)에서 유용산물(2차 대사산물)을 효과적으로 생산하는 것으로 이루어져 있다(미합중국특허 제5,882,849호; 제6,022,701호).
- <31> 상기 각각 설치된 2개의 배양조를 구비한 배양기술은 각각의 조건을 갖는 배양조를 구비하고, 그 목적에 적합한 성장조건을 구현함으로써, 종래 연못(pond) 형태나 외륜(paddle wheel)으로 배지를 순환시키는 수로(raceway) 형태의 옥외배양법에 비해 고농도 배양이 용이하고 다른 미생물에 의해 오염되는 것을 막을 수 있어 유용산물의 회수비용을 줄일 수 있는 장점이 있다.
- <32> 그러나, 상기 각각 설치된 2개의 배양조를 구비한 배양기술은 해결해야 할 여러 문제점들이 있다. 구체적으로, 균체의 성장을 위한 단계 1 공정의 배양조와 유용산물의 생산을 위한 단계 2 공정의 배양조를 각각 설치해야 하는 관계로, 이에 따른 지대(land cost)나 설치비 및 운전비가 증가하게 되고, 복잡한 조업을 수행함으로 고도의 숙련된 기술자가 필요하게 된다.

또한, 이로 인하여 광합성 미생물에서 유래된 고부가 유용산물의 생산공정을 상용화하는데 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <33> 본 발명의 목적은 상기 기술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 구체적으로 특정 광합성 미생물을 이용하여 고부가 유용산물을 생산하는 경우, 내부영역을 균체성장 영역과 유용산물 생산영역으로 구분된 다중 광생물반응기를 이용함으로써, 균체 성장을 위한 배양 및 유용산물 유도에 필요한 노동력을 줄일 수 있으며, 경제적으로 유용산물을 얻을 수 있는 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법을 제공하는 것이다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

- <34> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역; 상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역; 및 상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 양자 사이에 형성된 투명분리장치를 포함하여 이루어지며, 배양을 위해 조사되는 태양광 또는 인공광이 유용산물 배양영역을 통과한 후 투명분리장치를 거쳐 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 유용산물 배양영역은 반응기내의 외측에 형성되며, 균체성장용 배양영역은 반응기 내의 내측에 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기를 제공하는 것이다. 또한, 상기 기술된 바와 같은 균체성장용 배양영역, 유용산물 배양영역 및 투명분리장치를 포함하며, 추가로 광을 조사하기 위한 광조사장치를 포함하여 이루어지

며, 광조사장치를 통해 조사되는 광이 상기 유용산물 배양영역을 통과한 후 투명분리장치를 거쳐 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 유용산물 배양영역은 광조사장치와 접하도록 형성되고, 균체성장용 배양영역은 광조사장치와 접하지 않도록 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기를 제공하는 것이다.

<35> 또한, 본 발명은 상기 다중 광생물반응기를 이용한 광합성 미생물의 배양방법을 제공하는 것이다.

<36> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<37> 본 발명은 다중 광생물반응기를 제공한다.

<38> 먼저, 본 발명의 다중 광생물반응기는 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역과 상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역으로 이루어져 있으며, 상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 양 영역 사이에 형성된 투명분리장치를 포함하여 이루어진다.

<39> 이러한 광생물반응기의 구조로 인해 본 발명의 다중 광생물반응기는 광원에 가까운 쪽에 형성된 유용산물 생산용 배양영역에 과도한 빛에너지를 공급할 수 있으며, 그로 인해 유용산물 생산용 배양영역내의 특정 균체가 고광도의 빛에너지를 이용하여 대사산물을 축적할 수 있도록 유도한다. 이때, 빛에너지는 상기 유용물질 생산용 배양영역을 통과하면서 배양액내의 바이오매스로 인한 그림자효과(mutual shading)의 영향으로 조사면의 반대편으로 저광도의 잔여 빛에너지로 방출되게 되며, 상기 저광도의 잔여 빛에너지는 유용산물 생산용 배양영역과 접

하고 다중 광생물반응기의 내부에 설치된 균체성장용 배양영역에 존재하는 광합성 미생물에 공급되어 균체성장을 위한 광합성 과정을 수행하게 된다.

- <40> 상기 빛에너지는 하기 수학식 1에 나타낸 바와 같이 비어-람버트 법칙(Beer-Lambert's Law)에 따라 광원에서 멀어질수록( $d$  증가) 그리고 배양액 내부의 균체농도가 증가할수록( $\rho$  증가) 지수적으로 감소하게 된다.

<41> 【수학식 1】  $I = I_0 \exp(-\delta \rho d)$

- <42> (상기식에서,  $I$ 는 투과된 빛의 세기,  $I_0$ 는 광원의 세기,  $\delta$ 는 흡수계수,  $\rho$ 는 균체의 농도,  $d$ 는 균체가 존재하는 흡수층의 두께를 나타낸 것이다.)

- <43> 이때, 유용산물 생산용 배양영역을 투과하면서 초래되는 빛에너지 감소량은 광원의 광도( $I_0$ ), 유도영역에 존재하는 바이오매스의 농도( $\rho$ ), 균체의 크기 및 색소함량, 빛 투과거리(light penetrating depth;  $d$ ) 등에 영향을 받게 된다. 이에, 배양시 균체성장용 배양영역으로 공급되는 빛에너지 공급량을 균체의 성장에 적절한 수준이 되도록 유지해야 한다. 배양시 빛에너지 공급량이 너무 적으면 유용산물 배양영역내에서 유용산물을 축적할 수 없으며, 반대로 빛에너지 공급량이 너무 많으면 균체성장용 배양영역에서 균체성장이 저해될 뿐만 아니라 광합성에 사용되지 않은 빛에너지가 열에너지로 전환되어 배양액의 온도를 상승시키게 된다.

- <44> 본 발명의 다중 광생물반응기에서 배양을 위해 조사되는 광원으로는 태양광이 대표적이다. 이때 태양광이 유용산물 배양영역을 통과한 후 상기 투명분리장치를 거쳐 상기 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 유용산물 배양영역을 반응기내의 외측에 형성시키며, 상기 균체성장용 배양영역을 반응기내의 내측에 형성시킨다.

<45> 본 발명은 광원으로써 태양광 뿐만 아니라, 인공광원인 광조사장치를 포함한다. 이때 광조사장치를 통해 조사되는 광이 유용산물 배양영역을 통과한 후 투명분리장치를 거쳐 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 광조사장치가 유용산물 배양영역과 접하도록 형성시키고 균체성장용 배양영역과 접하지 않도록 형성시킨다. 적용가능한 광원으로는 형광램프, 할로겐 램프, 광섬유, 네온관 및 발광다이오드 소자 등 광합성에 적합한 빛(PAR: Photosynthetically Active Radiation)을 발하는 광원 중에서 선택된 한 개 이상의 것을 사용할 수 있다. 또한, 상기 광원들의 운전은 한 종류의 광원을 사용하거나 두 종류 이상의 광원을 복합적으로 활용할 수 있으며, 태양광을 빛에너지 공급원으로 기본적으로 이용하고, 계절적(겨울), 시간적(야간), 기상적(흐린 날) 요인 및 균체 성장과 효과적인 대사산물의 축적에 따라 모자라는 빛에너지를 추가 광원을 이용하여 불충분한 빛에너지를 공급하는 방법도 가능하다. 구체적으로 도 6, 도 7과 도 10에서 보는 바와 같이, 상기 광생물반응기의 최외측과 최내측에는 유용산물 배양영역이 형성되어 태양광이 상기 최외측의 유용산물 배양영역에 조사되고 광조사장치가 상기 최내측의 유용산물 배양영역에 조사되도록 한다.

<46> 또한, 상기 광조사장치는 개별적인 장치로 구비하는데, 이는 상기 장치가 단선 등의 문제 발생시 전체 광도에 영향을 주지 않게 하기 위한 것이다.

<47> 이러한 광원을 활용하는데 있어서, 빛에너지 공급량 및 파장, 빛에너지 공급시간 및 주기를 본 발명의 다중 광생물반응기내에 설치된 균체성장용 배양영역의 균체성장에 적합하거나, 유용산물 생산영역의 유용산물 생산에 적합하도록 조절할 수 있으며, 본 발명에서는 이에 대해 한정하지 않는다.

- <48> 본 발명의 광생물반응기는 여러 가지 형태로 제작할 수 있으며, 구체적으로 직육면체의 평면판, 원통형, 튜브형 및 입체형으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태로 제작할 수 있다.
- <49> 또한, 광생물반응기는 산업적인 활용을 위해서 배양용량의 증가(scale-up)가 필수적인데, 이를 위하여 각각의 다중 광생물반응기를 단위장치(unit module)로 활용하여 이를 연속적으로 설치(stacking)할 수 있다. 이와 같은 복합 광생물반응기는 필요에 따라 평면판 형태의 광생물반응기와 광원을 샌드위치(sandwich) 형식의 1차원적인 다중배열이 가능하며, 수직원통 형태의 광생물반응기와 광원은 2차원적으로 배열하는 것이 가능하며, 또한 기타 가능한 3차원적인 배열이 가능하며, 전체 규모는 생물공정 규모와 공장 부지를 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 또한 설치된 단위 광생물반응기와 광원을 제거하거나 중간연결 파이프라인을 차단하는 방법으로 배양용량을 손쉽게 감소(scale-down)시킬 수 있다.
- <50> 한편, 균체성장용 배양영역과 유용산물 생산용 배양영역의 하단부에서 기체를 상향 공급함으로써 탄소원으로서의 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)의 공급과 공급배양액의 상향유동을 야기할 수 있으며, 이를 위하여 공기부양(air-lift) 방식과 여기에 기계적 교반(impeller, magnetic stirrer 등)을 추가한 터빈(stirred-tank) 방식 등이 사용될 수 있다.
- <51> 또한 하절기에는 광원에서 유래된 열, 높은 외부온도. 균체 대사열 및 균체로 흡수되지 않는 빛에너지가 열에너지로 전환되면서 배양액의 온도가 증가하며, 반대로 동절기나 야간에는 적정 온도 이하로 배양온도가 떨어지면서 균체 성장 및 유용산물의 생산을 저해하게 된다. 따라서 광합성 미생물 성장 및 유용산물의 생산에 최적인 상태로 배양액의 온도를 유지할 필요가

있는 경우에는 냉각수 또는 온수를 열교환기 및 분무기(sprayer)를 설치하거나, 차양막(sun screen) 등을 사용하여 배양온도를 조절할 수 있다.

<52> 이하, 첨부된 도면을 참조로 본 발명의 바람직한 실시형태를 설명한다.

<53> 제 1실시형태로, 태양광을 사용한 경우의 광생물반응기이다.

<54> 도 1a 및 도 1b는 외부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 평면판(flat plate)의 양쪽 측면으로 빛에너지(3)가 공급되며, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 반응기 내부에 설치되고 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)으로 구성된 본 발명의 한 형태인 외부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<55> 도 2a 및 도 2b는 외부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 수직 원통형(cylinder)의 외부표면으로 빛에너지(3)가 공급되고, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)에 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 외부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<56> 도 3a 및 도 3b는 태양광을 이용한 관형(tubular) 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 옥외 배양시 태양광을 빛에너지(3)로 이용하고, 태양광이 직접적으로 조사되는 반응기 내부영역에서는 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고,



상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 관형(tubular) 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<57> 도 4a 및 도 4b는 내부 조사형 이중 평면판 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 평면판의 중앙에 설치된 빛에너지(3) 공급장치를 중심으로 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 내부 조사형 이중 평면판(double flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

<58> 도 5a 및 도5b는 도 4의 이중 평면판 형태의 다중 광생물반응기를 단위장치(unit module)로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 도면내에 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하고 있다.

<59> 도 6a 및 도 6b는 도 1 및 도 4의 복합 형태인 외·내부 조사형 삼중 평면판(triple flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 평면판의 양쪽 측면과 반응기의 중앙에서 빛에너지(3)가 공급되고, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 외·내부 조사형 삼중 평면판(triple flat-plate) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.

- <60> 도 7a 및 도 7b는 도 6의 외·내부 조사형 삼중 평면판 형태의 다중 광생물반응기를 단위 장치로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 도면내에 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하고 있다.
- <61> 도 8a 및 도 8b는 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 수직 원통형의 중앙에 설치된 빛에너지(3) 공급장치를 중심으로 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되고, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)에 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 내부 조사형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.
- <62> 도 9a 및 도 9b는 상기 내부 조사형 이중 수직원통 형태의 광생물반응기를 단위장치로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하였다.
- <63> 도 10a 및 도 10b는 외·내부 조사형 삼중 수직원통 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것으로, 구체적으로 수직 원통형의 외부와 반응기의 중앙에서 빛에너지(3)가 공급되고, 조사면을 포함하는 반응기 내부영역에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역(1)과 접하여 유용산물 생산용 배양영역을 투과한 빛에너지가 공급되는 균체 성장용 배양영역(2)이 반응기 내부에 설치된 본 발명의 한 형태인 외·내부 조사형 삼중 수직원통(triple cylinder) 형태의 다중 광생물반응기를 나타낸 것이다.
- <64> 도 11a 및 도 11b는 상기 삼중 수직원통 형태의 광생물반응기를 단위장치로 활용하여 이를 연속적으로 배열하는 방식을 나타낸 것으로, 각각의 단위장치의 설치방법과 빛에너지의 공급방향을 예시하였다.

- <65> 또한, 본 발명은 상기 다중 광생물반응기를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법에 있어서, 보다 상세하게 회분식(batch), 연속식(continuous) 및 유가식(fed-batch) 배양방법을 제공하고자 하나, 본 발명의 배양방법에 대한 이해를 돕기 위한 것에 불과하며 본 발명이 이에 한정된 것은 아니다.
- <66> 구체적으로, 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 회분식 배양방법에 있어서, 광합성 미생물을 광생물반응기의 균체성장용 배양영역 및 유용산물 생산영역에 주입하는 단계(회분배양 1 단계),
- <67> 상기 유용산물 생산영역을 향해 빛을 조사하여 광합성 미생물을 배양하여 유용산물 축적량을 최대화하는 단계(회분배양 2 단계), 및
- <68> 상기 배양 후 유용산물 생산영역과 균체성장 영역의 광합성 미생물을 수확하는 단계(회분배양 3 단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법을 제공한다.
- <69> 회분배양 1 단계에서는 본 발명의 광생물반응기 내부의 각 배양영역에 광합성 미생물을 주입한다. 본 발명의 광생물반응기를 이용하여 배양할 때, 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역에는 동일한 농도를 접종할 수 있고, 필요에 따라서 서로 다른 농도로 접종하거나 또한 이미 각 광도에 적응된 광합성 미생물을 이용하여 접종할 수도 있다. 이는 균체성장 배양 조건하에서 두 영역 모두에 주입된 광합성 미생물을 균체성장시키기 위한 것이다. 이때, 최초 주입 농도는 공급하는 빛의 양이 세포의 크기에 따라 상호그늘(mutual shading)이 생기지 않

는 농도로 주입해야 한다. 일예로, 클로렐라(*Chlorella*)의 경우,  $10^3 \sim 10^8$  cell/ml의 농도로 주입하고, 해마토코쿠스(*Haematococcus*)의 경우,  $10^3 \sim 10^7$  cell/ml의 농도로 주입한다. 이때 배지의 경우, 광합성 미생물에 따라 선택하여 사용할 수 있다.

<70> 회분배양 2 단계에서는 균체성장 및 유용산물 생산을 진행하기 위하여 상기 유용산물 배양영역을 향해 빛을 조사한다. 이때, 최초 빛의 광도는 광생물 미생물의 균체성장(optimal condition)에 맞도록 조절한다. 이는 최초 주입한 광합성 미생물을 균체성장 시키기 위한 것으로, 일예로, 해마토코쿠스의 경우 유용산물 생산영역의 표면광도가  $40 \sim 200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준이 되도록 빛의 광도를 조절하며, 이때 유용산물 생산영역을 투과한 후, 균체성장 영역에 도달한 빛의 광도는  $10 \sim 50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 감소한다. 그외 pH, 온도 및 가스 주입량은 광합성 미생물에 따라 조절할 수 있으며, 일예로, 해마토코쿠스를 사용할 경우, pH 7.0, 온도  $25^\circ\text{C}$  그리고 가스 주입량은  $100 \text{ ml}/\text{min}$ 으로 95 %의 공기에 5 %의 이산화탄소를 포함한 가스를 사용할 수 있다.

<71> 상기 광도로 일정시간 동안 조사하면, 유용산물 생산영역 내의 광합성 미생물의 균체 성장을 멈추는 정지기가 도래하며, 이때 광합성 미생물은 이차대사산물을 축적한다. 이러한 정지기는 배양영역 내에 주입한 광합성 미생물의 농도, 최초 조사된 광도 및 광합성 미생물의 종류에 따라 차이가 있으며, 하기 실시예의 조건하에서는 10일의 정지기를 확인하였으며, 아스타잔틴의 축적량은  $20 \sim 360 \text{ mg}/\text{L}$ 로 증가하였다(도 13c 및 도 13d 참조).

<72> 이러한 정지기 이후 광도를 유용산물 생산조건(stressed condition)을 조절하여 조사하는데, 상기 균체성장 배양 조건에 비해 고광도로 조사하게 된다. 상기 유용산물 생산조건의

광도는 광합성 미생물의 종류에 따라 다양하게 조절할 수 있는데, 일예로 해마토코쿠스의 경우, 아스타잔틴 생산영역으로 조사되는 빛에너지의 표면광도는 균체농도에 따라  $200 \sim 2,000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 조절한다. 이때부터 각 배양영역에 따라 구별되어 배양하게 되는데, 구체적으로, 고광도의 빛에너지를 조사받게 되는 유용산물 배양영역 내의 광합성 미생물은 고농도의 유용산물을 축적하게 되며, 빛에너지는 상기 영역을 통과하면서 감소되어 균체성장 배양영역에 조사될 때에는 이에 적합한 광도를 갖게 되며, 일예로 해마토코쿠스의 경우 균체성장 영역의 표면광도가  $10 \sim 100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 감소하게 되고, 이를 이용하여 균체를 성장시키게 된다. 첨부된 도 14a 및 도 14b에는 이러한 결과를 나타내는 그래프를 볼 수 있다. 상술한 바와 같이, 광생물반응기로의 빛에너지 공급은 광합성 미생물의 유도에 적합하도록 높은 광도로 조사하여 유용산물을 우선적으로 생산○축적하도록 유도하고, 이때 소모되지 않고 방출하는 빛에너지를 균체성장을 위하여 사용함으로써 광생물반응기에 공급되는 빛에너지의 효율을 극대화할 수 있다.

<73> 회분배양 3 단계에서는 유용산물 축적량이 최대에 도달한 후 유용산물 생산영역의 균체를 수확하여 균체로부터 유용산물을 분리, 정제, 농축하는 공정(downstream process)으로 진행한다. 동시에 균체성장용 배양영역의 균체는 다음번 회분식 배양의 접종용으로 활용하게 된다.

<74> 다음으로, 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 회분식 배양방법으로는 배양과정에 있어 필요한 영양분을 일시적 또는 연속적으로 공급하는 과정을 포함하는 광합성 미생물의 배양 방법을 제공한다.

- <75> 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 연속식 배양방법에 있어서,
- <76> 상기 회분식 배양 후 균체 성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물을 유용산물 배양 영역으로 이동시킨 후, 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입하는 단계(연속배양 1 단계),
- <77> 상기 유용산물 생산영역을 향해 빛을 조사하여 광합성 미생물을 배양하고 유용산물을 축적하는 단계(연속배양 2 단계), 및
- <78> 상기 연속배양 2단계를 거친 후 유용산물 생산영역의 광합성 미생물을 수확하고, 상기 연속배양 1단계와 연속배양 2단계를 반복적으로 수행하는 단계(연속배양 3 단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법을 제공한다.
- <79> 연속배양 1 단계는 회분식 배양 후 회분배양 1단계와 같이 광생물반응기의 각 영역에 광합성 미생물을 주입한다. 구체적으로 유용산물을 축적한 유용산물 생산영역내의 광합성 미생물을 수확하며, 균체성장용 배양영역내의 광합성 미생물을 유용산물 생산영역으로 이동시킨다. 이후 균체배양에 사용될 새로운 광합성 미생물을 계대배양에서 수확하여 배지와 함께 균체성장용 배양영역내에 주입한다. 또한 균체성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물 중 일부를 남기고 유용산물 배양영역으로 이동시킨 후, 새로운 배지를 균체성장용 배양영역에 주입하여 새로운 배양을 실시하는 경우로 대체될 수 있다,
- <80> 이때, 광합성 미생물의 이동방법은 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하거나, 공기압력에 의해 밀어 올려주는 방법 등을 사용한다. 상기 연동펌프를 이용한 경우, 수축이 용이한 관을 통해서 성장용 배양영역에서 고농도로 성장한 균체를 포함한 유체를 유용산물 배양영역으로

밀어 넣는다. 또한 공기압력에 의해 밀어 올려주는 방법을 이용한 경우, 균체성장용 배양영역내의 세포와 배양액을 외부공기와 차단된 멸균상태에서 수확한 후 공기의 압력에 의해서 밀어 올려준다. 상기 기술된 방법으로 새로운 광합성 미생물을 주입한다. 이러한 방법에 의해 연속적으로 이동시킬 수 있는 장점이 있다.

<81> 연속배양 2 단계는 광합성 미생물의 이동 및 주입 후 유용산물 생산영역의 방향으로 빛을 조사한다. 이때, 빛의 광도는 회분배양 2단계와 마찬가지로 유용산물 배양을 위한 고광도(stressed condition)로 조사를 하며, 회분배양 2단계의 후반부의 광도와 동일한 광도로 조사하며, 동일한 효과를 얻을 수 있다.

<82> 연속배양 3단계에서는 광합성 미생물을 연속적으로 그리고 대량으로 생산하기 위하여, 상기 연속배양 1단계 및 2단계를 반복적으로 수행하기 위한 중간단계이다. 구체적으로는 펌프나 공기압력을 이용하여 균체 성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물을 유용산물 배양영역으로 이동시키고 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입 이동시키는 연속배양 1단계와, 고광도의 빛을 조사하여 유용산물을 축적과 균체배양이 동시에 이루어지는 연속배양 2단계를 반복적으로 수행함으로써, 유용산물을 축적한 광합성 미생물을 연속적이고 대량으로 얻을 수 있다.

<83> 본 발명의 다중 광생물반응기를 이용한 유가식 배양방법에 있어서,

<84> 상기 회분식 및 연속식 배양이 진행됨에 따라 영양성분이 고갈되는 경우, 광합성 미생물의 균체성장 및 유용산물의 생산에 적합한 농도를 유지하기 위하여 필요한 영양성분을 공급할 필요가 있다. 일 예로 해마토코쿠스의 배양의 경우에 질소원의 농도를 배양 초기농도로 유지하는 것이 균체 성장에 효과적임이 알려져 있으므로(*Enzyme Microbial Technol.*, 2003, 33:403-409), 균체성장 영역에서는 질소원의 유가식 배양을 수행할 필요가 있다.

<85> 본 발명의 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 배양방법에 적용할 수 있는 광합성 미생물은 균체 성장과 유용 대사산물 생산의 최적 환경 상태가 차이를 나타내는 모든 광합성 미생물을 포함하며, 일 예로, 해마토코쿠스(*Haematococcus* sp.), 듀나리엘라(*Dunaliella* sp.), 클로로코쿰(*Chlorococcum* sp.), 클로렐라(*Chlorella* sp.), 아세타블라리아(*Acetabularia* sp.), 마이크로시스티스(*Microcystis* sp.), 노스톡(*Nostoc* sp.), 오실라토리아(*Oscillatoria* sp.) 등이 있다.

<86> 이하에서는 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 보다 상세하게 예시하고자 한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것에 불과하며 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<87> <실시예 1> 본 발명의 광합성 미생물의 배양

<88> 실시예 1에서는 도 12a 및 도 12b에 나타난 하부 기체 주입형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였다. 구체적으로, 상기 다중 광생물반응기는



수직 원통형의 외부에 설치된 발광체(8)를 이용하여 빛에너지가 공급되고, 빛에너지가 직접적으로 조사되는 외부재킷 부분에 유용산물 생산용 배양영역(1)이 설치되며, 상기 유용산물 생산용 배양영역의 내부코어(inner core) 부분에 균체 성장용 배양영역(2)이 설치된 형태로 제작하였다. 또한, 상기 기포탑 광생물반응기는 700 ml 용량의 외부재킷과 700 ml 용량의 내부코어로 설계하여 제작되었다.

<89> 이때 각각의 영역 하단부에는 폭기 장치를 설치하여 유용산물 생산용 배양영역을 위한 기체 공급 장치(5)와 균체성장용 배양영역을 위한 기체 공급 장치(6)로부터 가스를 상향 공급함으로써 배양액의 상향유동을 야기시키며, 빛에너지 공급을 위한 발광체로는 직관 형광램프(8)를 사용하고 있으며 안정기와 점멸스위치가 설치되었다.

<90> 광합성 미생물은 고부가 유용산물인 아스타잔틴(astaxanthin)을 생산하는 것으로 알려진 헤마토코쿠스(*Haematococcus pluvialis* UTEX16) 균주를 배양하였고, 영양배지로는 MBBM(Modified Bold's Basal Medium)를 사용하였다.

<91> (회분배양 1 단계) 광합성 미생물의 주입

<92> 상기 기술된 광생물반응기에 구비된 외부재킷(유용산물 배양영역)과 내부코어(균체성장용 배양영역)에 각각  $1.2 \times 10^4$  cell/ml 수준으로 주입하였다.

<93> (회분배양 2 단계) 배양

<94> 직관 형광램프(8)를 이용하여 빛에너지를 공급함으로써 배양을 수행하였다. 이때, 최초 배양부터 10일 동안은 외부재킷의 표면광도를  $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 유지하였으며, 10일 이후 빛에너지를 증가시켜  $770 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 유지하였다.

- <95> 배양시 유체의 흐름과 배양액의 혼합 및 탄소원의 공급을 위하여 5% CO<sub>2</sub> 기체를 공기와 혼합하여 주입하였고, 통기량은 외부재킷과 내부코어 모두 100 ml/min으로 조절하였다.
- <96> (연속배양 1단계) 이동 및 재접종
- <97> 상기 최초 배양일로부터 24일 이후에 배양을 마치고, 연동 펌프를 이용하여 유용산물 배양영역 및 균체성장용 배양영역의 광합성 미생물을 각각 추출 및 유용산물 배양영역으로 이동시킨 후 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입하였다.
- <98> (연속배양 2단계) 배양
- <99> 빛에너지 공급량을 표면광도가 770  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 조사하여 외부재킷에 존재하는 균체가 아스타잔틴을 축적할 수 있도록 유도(induction)하였고, 균체성장 영역(내부코어)은 외부 유용산물 생산 영역(외부재킷)을 투과한 빛에너지가 균체성장에 적합한 광도로 감소되어 균체가 지속적으로 성장할 수 있도록 하였다. 이외의 환경조건은 상기 (2)의 후반부에 기술된 고광도의 조사시 환경조건과 동일하게 유지하였다.
- <100> <실험예 1>
- <101> 본 발명의 회분배양 1단계 및 2에 의한 균체의 생체 중량 및 아스타잔틴의 총량을 측정하기 위하여 실험을 수행하였다.
- <102> 구체적으로, 광생물반응기는 상기 실시예 1의 하부 기체 주입형 이중 수직원통 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였다(도 12a 및 도 12b 참조).

- 103> 광합성 미생물은 고부가 유용산물인 아스타잔틴(astaxanthin)을 생산하는 것으로 알려진 해마토코쿠스(*Haematococcus pluvialis* UTEX16) 균주를 배양하였고, 영양배지는 MBBM(Modified Bold's Basal Medium)를 사용하였다.
- 104> 반응기 외부재킷의 표면광도를  $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 를 유지하였고, 외부재킷과 내부코어를  $1.2 \times 10^4 \text{ cell}/\text{mL}$  수준으로 주입하여 배양을 시작하였다.
- 105> 이때 유체의 흐름과 배양액의 혼합 및 탄소원의 공급을 위하여 5%  $\text{CO}_2$  기체를 공기와 혼합하여 주입하였고, 통기량은 외부컬럼과 내부코어 모두  $100 \text{ mL}/\text{min}$ 으로 조절하였다.
- 106> 배양시간은 0~24일이며, 2일이 경과 후 균체의 생체 중량(fresh weight) 및 아스타잔틴(astaxanthin) 총량을 측정하였다. 이에 대한 결과는 도 12c 및 도 12d에 나타내었다. 이때, 화살표는 배양 10일이 지난 후 저광도에서 고광도로의 변화시점을 표시한 것이다.
- 107> 도 12c 및 도 12d에서 보는 바와 같이, 배양을 시작 후 외부재킷과 내부코어의 균체가 비슷한 수준으로 성장하다가, 배양 6일이 경과하면서 외부컬럼과 내부코어의 생체중량에 차이를 나타내기 시작하였다. 이와 같은 현상은 외부재킷의 균체가 고농도로 증가함에 따라 그림자 효과가 증가되어 내부코어에 존재하는 균체에 불충분한 빛에너지가 공급되면서 발생하는 현상이다.
- 108> 배양 10일의 시점부터 빛에너지 공급량을 표면광도가  $770 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준이 되도록 증가시키는 방법으로 외부재킷에 존재하는 균체가 아스타잔틴을 축적할 수 있도록 유도(induction)하였고, 내부코어 영역은 외부재킷 영역을 투과한 빛에너지가 균체성장에 적합한 광도로 감소되어 균체가 지속적으로 성장할 수 있도록 하였다. 이때 빛조건 이외의 환경조건은

내부코어의 균체가 최적성장을 할 수 있도록 고농도의 영양성분을 주기적으로 공급한 반면, 외부컬럼 영역으로는 영양성분이 고갈된 상태가 유지되도록 하였다. 그 결과 외부재킷과 내부코어에 존재하는 균체성장 및 아스타잔틴의 축적패턴이 도 12c와 도 12d에 나타낸 바와 같이 뚜렷한 차이를 나타냈으며, 최종적으로 외부재킷 영역의 균체는 효과적인 유용산물의 생산이 이루어져 아스타잔틴 총량이 332 mg/ℓ에 도달하였고, 이때 세포 크기는 평균 36.27 μm로 확대되고, 최대 세포농도  $5.8 \times 10^5$  cell/ml와 생체중량(fresh weight) 9.94 g/ℓ의 균체를 얻을 수 있었다. 동시에 내부코어 영역에서는 균체가 지속적으로 성장하여 최대 세포농도  $3.2 \times 10^5$  cell/ml 및 생체중량 6.1 g/ℓ에 도달한 반면 아스타잔틴의 축적량은 31 mg/ℓ로 유지되어, 유용산물의 생산이 억제된 상황에서 지속적인 균체성장이 가능함을 확인할 수 있다.

<109> <실험예 2>

<110> 다른 형태의 광생물반응기를 이용한 균체성장 및 아스타잔틴의 총량을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

<111> 실험예 2에서는 도 13a 및 도 13b에 나타낸 바와 같이, 기체 주입방법이 다른 상부 및 하부 기체 주입형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였다. 구체적으로 상기 광생물반응기는 본 발명의 한 실시예인 외부조사형 이중 수직원통 광생물반응기(double cylinder photobioreactor)를 나타낸 것으로, 도 12의 반응기의 경우와 마찬가지로 배양액을 담을 수 있는 반응기 내부영역은 유용산물 생산용 배양영역(1)에 해당하는 수직원통형의 외부재킷과 균체 성장용 배양영역(2)에 해당하는 내부코어로 구성되어 있다. 또한 수직원통형의 외부에 설치된 직관 형광램프(8)를 이용하여 빛에너지를 공급하고, 유용산물 생산용

배양영역(1)을 위한 가스 공급 장치(5)는 반응기 하부에 설치하여 가스공급으로 인한 밀도차를 이용하여 배양액 내의 균체를 혼합(mixing)하게 된다. 도 12에 나타낸 반응기와의 차이점은 내부코어영역을 위한 가스 공급 장치(6)가 도 12는 반응기의 하부에 설치된 반면, 도 13의 반응기는 반응기 상부에 설치된 직립 스테인레스관을 통하여 내부코어의 하단부에서 기체를 발생할 수 있도록 설치되어 있다는 점이다.

- <112> 이때 상기 기포탑 광생물반응기는 500 ml 용량의 외부재킷과 500 ml 용량의 내부코어로 설계하여 제작되었다.
- <113> 유용산물 생산용 배양영역(1)의 외부재킷은 기포탑 광생물반응기 기저에서 혼합가스(5 % CO<sub>2</sub>)를 주입한 반면, 균체 성장용 배양영역(1)의 내부코어는 반응기 상부에서 스테인리스 (stainless steel) 직립 가스 주입관을 통하여 내부코어 영역의 하부까지 연결되도록 설치하여 혼합가스를 주입하였다.
- <114> 균주 및 배지는 상기 실시예 1에서와 같은 해마토코쿠스 균주와 MBBM 배지를 사용하였다
- <115> 통기량은 외부컬럼과 내부코어 각각 100 ml/min으로 유지하는 방법으로 유가식 배양을 수행하였다.
- <116> 발광체는 외부발광체로 직관형광램프를 이용하였고, 배양초기 외부컬럼의 표면 광도는 80  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 을 유지하다가, 배양 10일째부터 770  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  수준으로 광도를 증가시켜 외부 재킷과 내부코어 영역이 각각 유용산물 축적과 균체성장이 이루어지도록 하였다.
- <117> 배양시간은 0~24일이며, 2일이 경과 후 균체의 생체 중량(fresh weight) 및 아스타잔틴(astaxanthin) 총량을 측정하였다. 이에 대한 결과는 도 13c 및 도 13d에 나타내었

다. 상기 도면에서 화살표는 배양 10일에 저광도에서 고공도로의 광도의 변화가 일어나 시점을 표시한 것이다.

118> 도 13c 및 도 13d에서 보는 바와 같이, 배양 결과를 비교해 보면 외부재킷 영역에서 효과적인 유용산물 생산이 이루어져, 최종적으로 배양을 종료한 시점에서는 356 mg/l 수준의 아스타잔틴의 축적을 유도할 수 있었다. 이는 균체성장 영역에 해당하는 내부코어 영역의 아스타잔틴 축적량과 10배 이상의 높은 값에 해당하는 것으로, 이를 통하여 아스타잔틴 생산용 외부재킷 영역과 균체성장용 내부코어 영역으로 구성된 이중 광생물반응기를 실제 광합성 미생물의 배양에 적용이 가능함을 확인할 수 있었다.

#### <119> <실험예 3>

<120> 본 발명의 연속배양 1단계를 가정하여 외부재킷 및 내부코어에 서로 다른 균체 농도의 접종을 통하여 균체 및 유용산물을 얻기 위해 실험을 실시하였다.

<121> 실시예 3에서는 도 13a 및 도 13b에 나타낸 바와 같이, 기체 주입방법이 다른 상부 및 하부 기체 주입형 이중 수직원통(double cylinder) 형태의 기포탑 광생물반응기를 사용하였으며, 발광체는 광생물반응기의 외부에 구비 설치하였다. 이때 상기 기포탑 광생물반응기는 500 ml 용량의 외부재킷과 500 ml 용량의 내부코어로 설계하여 제작되었다.

<122> 유용산물 생산용 배양영역(1)의 외부재킷은 기포탑 광생물반응기 기저에서 혼합가스(5 % CO<sub>2</sub>)를 주입한 반면, 균체 성장용 배양영역(1)의 내부코어는 반응기 상부에서 스테인리스

(stainless steel) 직립 가스 주입관을 통하여 내부코어 영역의 하부까지 연결되도록 설치하여 혼합가스를 주입하였다.

<123> 균주 및 배지는 상기 실시예 1에서와 같은 해마토코쿠스 균주와 MBBM 배지를 사용하였다. 이때, 외부재킷에는 실시예 1 및 실시예 2의 내부코어에서 얻어진 균체를  $2.5 \times 10^5$  cell/ml의 수준으로 접종하였으며, 내부코어에는 새로운 균체를  $1.0 \times 10^5$  cell/ml의 수준으로 접종하였다.

<124> 통기량은 외부컬럼과 내부코어 각각 100 ml/min으로 유지하는 방법으로 유가식 배양을 수행하였다.

<125> 발광체는 외부발광체로 직관형광램프를 이용하였고, 배양초기 외부컬럼의 표면 광도는  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 를 유지하였다. 이때, 외부재킷내 균체로 인해 내부코어의 표면 광도는  $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 를 유지하였다.

<126> 배양시간은 0~16일이며, 1일이 경과 후 균체의 생체 중량(fresh weight) 및 아스타잔틴(astaxanthin) 총량을 측정하였다. 이에 대한 결과는 도 14a 및 도 14b에 나타내었다.

<127> 도 14a는 배양시간의 경과에 따른 광생물반응기 내부의 유용산물 생산용 배양영역(1)과 균체 성장용 배양영역(2)의 생체중량의 변화를 나타낸 것이며, 도 14b는 각 영역의 아스타잔틴 축적량의 변화를 나타낸 것이다. 배양 결과를 비교해 보면 효과적인 유용산물 생산이 이루어져, 최종적으로 배양을 종료한 시점에서는  $368 \text{ mg}/\ell$  수준의 아스타잔틴의 축적을 유도할 수 있었고, 이는 균체성장 영역에 해당하는 내부코어 영역의 아스타잔틴 축적량과 24.5 배 이상의 높은 값에 해당한다. 동시에 내부코어 영역에서는 균체가 지속적으로 성장하여 최대 세포농도

3.5  $\times 10^5$  cell/ml 및 생체중량 3.01 g/l 에 도달한 반면 아스타잔틴의 축적량은 15 mg/l 로 유지되어, 유용산물의 생산이 억제된 상황에서 지속적인 균체성장이 가능하였다.

- 128> 본 발명의 생물공정을 통하여 외부재킷의 균체가 고농도의 유용산물을 축적하므로 이를 수확하고, 내부코어의 균체성장영역에서 배양한 균체를 다음번 배양시의 외부재킷의 고농도 접종에 활용하게 된다. 따라서 지속적으로 내부코어에는 새로이 균체를 접종하고, 외부재킷의 접종은 이전 배양에서 고농도로 성장한 내부코어의 균체를 활용이 가능하게 되어 기존의 2 단계 배양을 단일 반응기에서 구현할 수 있음을 확인할 수 있었다.

#### 【발명의 효과】

- 129> 상술한 바와 같이, 본 발명의 다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법은 종래의 2단계 생물공정을 단일 반응기에서 구현한 것으로, 기존의 균체의 고농도 속성 배양 단계와 유용 대사산물의 생산단계로 구성된 2단계 생물공정을, 본 발명의 다중 광생물반응기의 내부영역을 균체성장 영역과 유용산물 생산영역으로 구분하여 설치하는 방법으로 공정을 단순화하였다. 이로 인하여 하나의 빛에너지를 이용하여 유용산물 배양 및 균체성장 배양을 동시에 수행할 수 있으며, 균체 성장을 위한 배양 및 생산물 유도에 필요한 노동력을 줄일 수 있고, 불필요한 2단계 과정의 생략함으로써 지대(land cost), 장치 설치비, 운전비의 비용 절감과 전력 소비량을 줄일 수 있고, 이를 통하여 유용산물의 생산공정의 경제성을 향상시킬 수 있다.



**【특허청구범위】****【청구항 1】**

균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역;

상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역; 및

상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 양 영역 사이에 형성된 투명분리장치를 포함하여 이루어지며,

배양을 위해 조사되는 태양광 또는 인공광이 상기 유용산물 배양영역을 통과한 후 상기 투명분리장치를 거쳐 상기 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 유용산물 배양영역은 반응기내의 광원 쪽에 형성되며, 상기 균체성장용 배양영역은 반응기내의 광원이 유용산물 배양영역을 통과하여 도달하는 쪽에 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기 및 상기 광생물반응기의 여러 단계 위의 공간적 배열에 의한 광생물반응기.

**【청구항 2】**

균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 균체성장용 배양영역;

상기 균체성장용 배양영역에 접하여 설치되고, 균체 및 배양액을 수용할 수 있는 하나 이상의 유용산물 배양영역;

상기 균체성장용 배양영역과 유용산물 배양영역을 분리하기 위해서 그 사이에 형성된 투명분리장치; 및

광을 조사하기 위한 광조사장치를 포함하여 이루어지며,

상기 광조사장치를 통해 조사되는 광이 상기 유용산물 배양영역을 통과한 후 상기 투명 분리장치를 거쳐 상기 균체성장용 배양영역에 도달하도록 하기 위해서, 상기 유용산물 배양영역은 상기 광조사장치와 접하도록 형성되고, 상기 균체성장용 배양영역은 상기 광조사장치와 접하지 않도록 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기 및 상기 광생물반응기의 여러 단위의 공간적 배열에 의한 광생물반응기.

### 【청구항 3】

제 2항에 있어서,

상기 광생물반응기의 최외측에는 유용산물 배양영역이 형성되어 태양광이 상기 최외측의 유용산물 배양영역에 조사되는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

### 【청구항 4】

제 2항 또는 제3항에 있어서,

상기 광조사장치는 형광램프; 할로겐 램프, 광섬유, 네온관, 발광 다이오드 소자로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 발광장치인 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

### 【청구항 5】

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 광조사장치는 개별적인 장치로 구비되는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 6】**

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 광생물반응기는 직육면체의 평면판, 원통형, 튜브형 및 입체모형으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태인 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 7】**

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 균체성장용 배양영역 및 유용산물 배양영역에 가스를 주입하기 위한 가스 주입 장치가 추가로 형성된 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 8】**

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 균체성장용 배양영역 및 유용산물 배양영역 내에 기계적 교반을 위한 임펠러 또는 자석 교반기가 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 9】**

제 1항, 제2항 또는 제6항에 있어서,

상기 광생물반응기는 1차원적, 2차원적 또는 3차원적으로 연속배열되어 있는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 10】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 광생물반응기를 회분식, 연속식 또는 유가식으로 운전하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물 배양방법.

**【청구항 11】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 광생물반응기는 온도변화장치 및 차양막을 구비하는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 12】**

제 11항에 있어서,

상기 온도변화장치는 열교환장치, 항온순환기 또는 분무장치인 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

**【청구항 13】**

광합성 미생물을 청구항 1 또는 2의 광생물반응기에 구비된 균체성장용 배양영역 및 유용산물 배양영역에 주입하는 단계(회분배양 1단계),

상기 유용산물 배양영역을 향해 빛을 조사하여 배양하는 단계(회분배양 2단계), 및

상기 배양 후 유용산물 생산영역과 균체성장 영역의 광합성 미생물을 수확하는 단계(회분배양 3단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법.

#### 【청구항 14】

광합성 미생물을 청구항 1 또는 2의 광생물반응기에 구비된 균체 성장용 배양영역에서 회분 배양 후 성장한 광합성 미생물을 유용산물 배양영역으로 이동시킨 후, 새로운 광합성 미생물을 균체성장용 배양영역에 주입하는 단계(연속배양 1단계),

상기 유용산물 생산영역을 향해 빛을 조사하여 광합성 미생물을 배양하고 유용산물을 축적하는 단계(연속배양 2단계), 및

상기 배양 후 유용산물 생산영역의 광합성 미생물을 수확하고, 균체성장용 배양영역에서 성장한 광합성 미생물의 전체 또는 일부를 유용산물 생산영역으로 이동하는 상기 1단계와 2단계를 반복적으로 수행하는 단계(연속배양 3단계)를 포함하는 것으로 이루어진 광합성 미생물의 배양방법.

#### 【청구항 15】

광합성 미생물을 제 1항 또는 제 2항의 광생물반응기를 이용하여 배양을 진행함에 따라 고갈되는 영양성분을 선택적으로 균체성장영역 또는 유용산물 생산영역에 공급하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 16】**

제 13항 또는 제14항에 있어서,

상기 단계 2의 빛 조사를 최초 조사부터 광합성 미생물의 정지기까지 균체성장 배양조건(optimal condition)으로 조사한 후 정지기 이후 유용산물 배양조건(stressed condition)으로 조사하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 17】**

제 14항에 있어서,

상기 단계 3의 이동을 연동 펌프를 이용하거나, 공기의 압력을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 18】**

제 14항에 있어서,

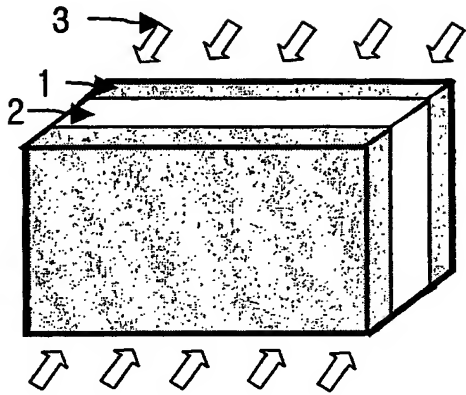
상기 단계 4의 조사 광도를 유용산물 배양조건(stressed condition)으로 조절하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

**【청구항 19】**

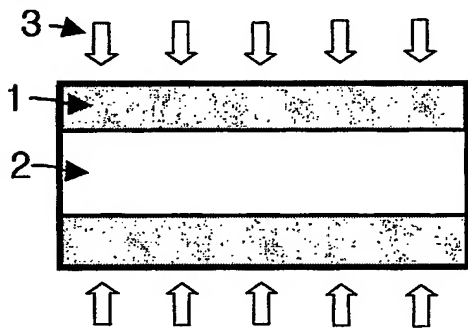
제 13항에 있어서, 상기 광합성 미생물이 해마토코쿠스, 듀나리엘라, 클로로코쿰, 클로렐라, 아세타블라리아, 마이크로시스티스, 노스톡 및 오실라토리아를 포함하는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물의 배양방법.

【도면】

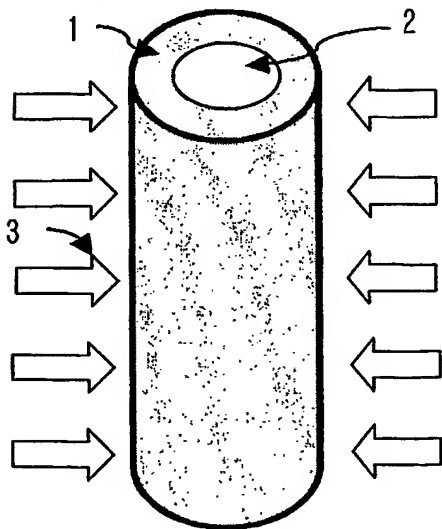
【도 1a】



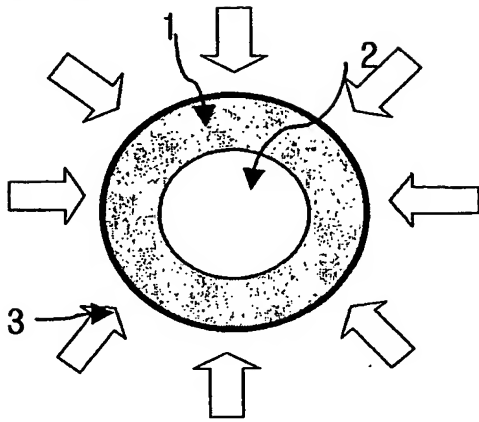
【도 1b】



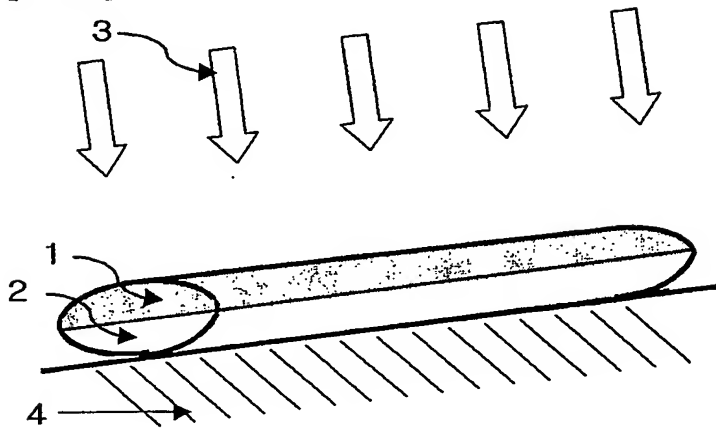
【도 2a】



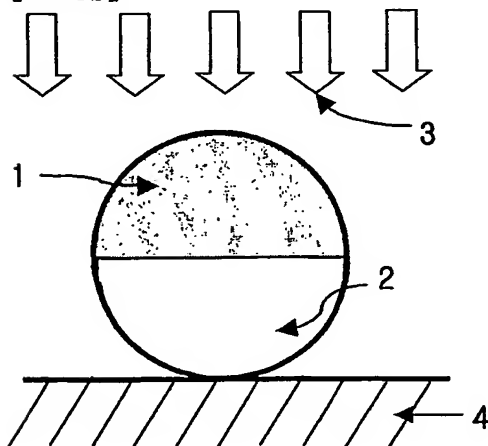
【도 2b】



【도 3a】



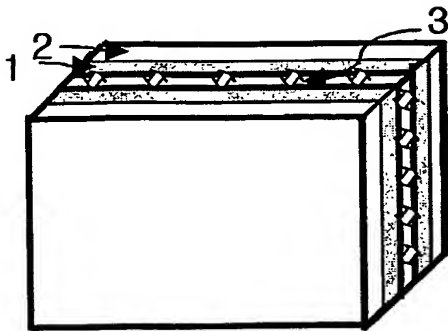
【도 3b】



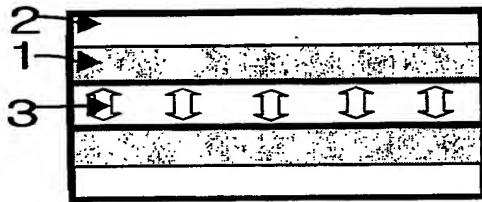
BEST AVAILABLE COPY



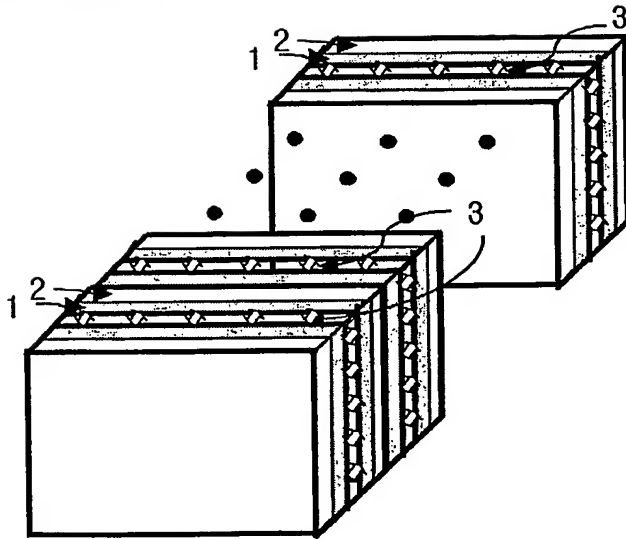
【도 4a】



【도 4b】

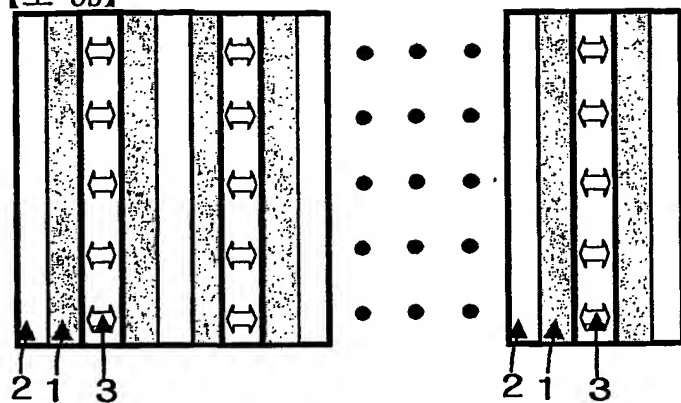


【도 5a】

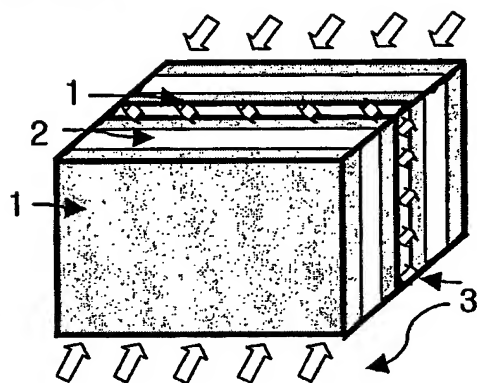


BEST AVAILABLE COPY

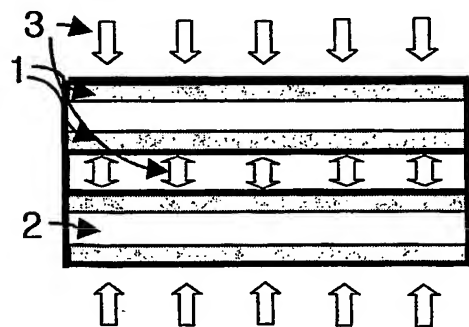
【도 5b】



【도 6a】

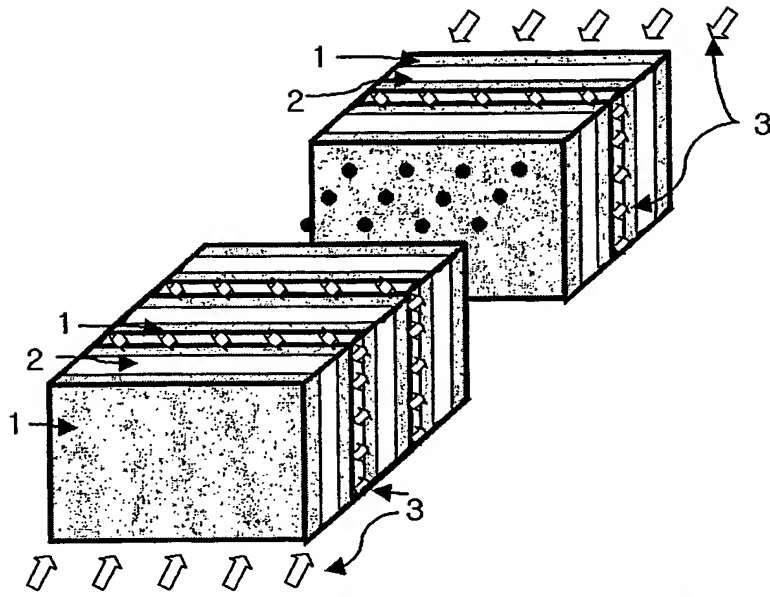


【도 6b】

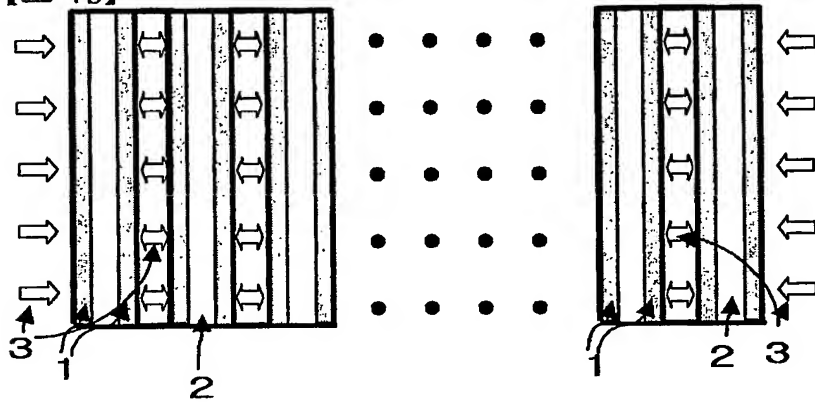


BEST AVAILABLE COPY

【도 7a】

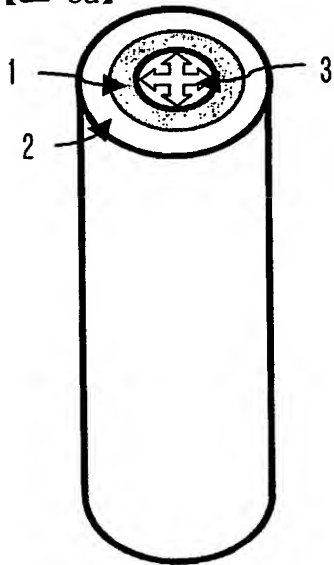


【도 7b】

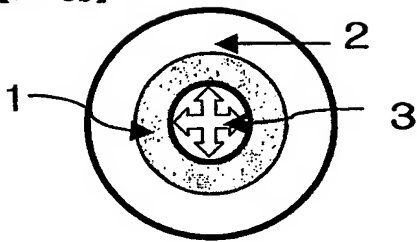


BEST AVAILABLE COPY

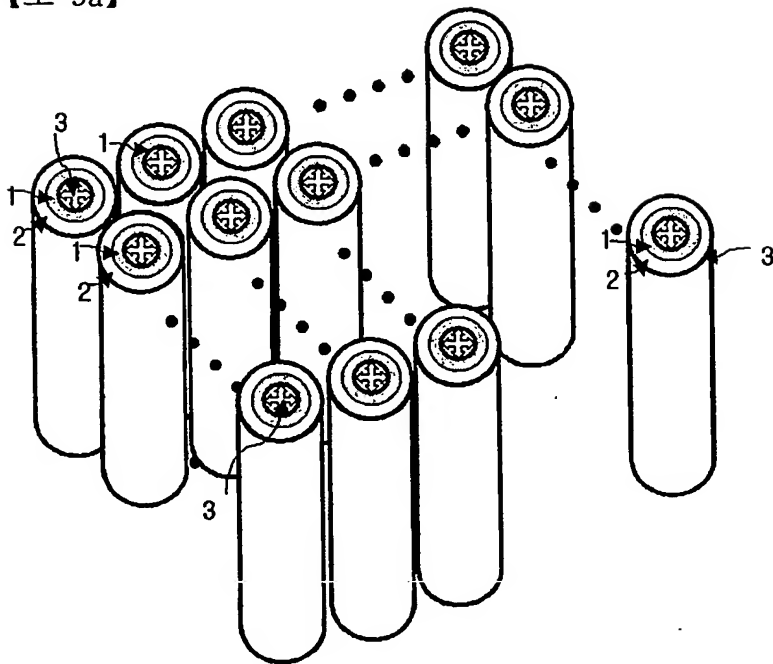
【도 8a】



【도 8b】

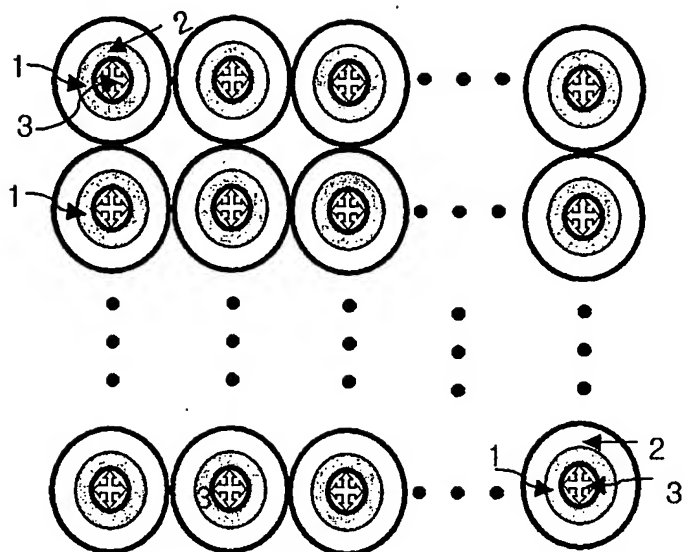


【도 9a】

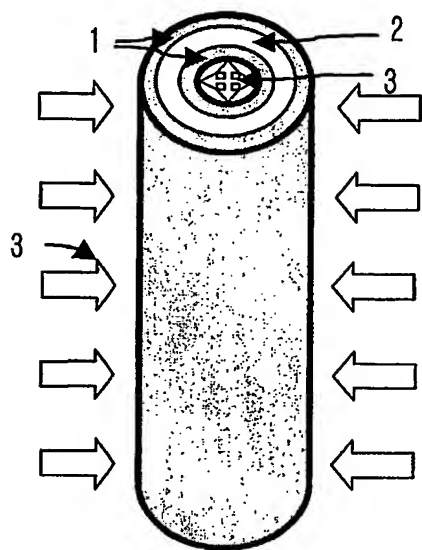


BEST AVAILABLE COPY

【도 9b】

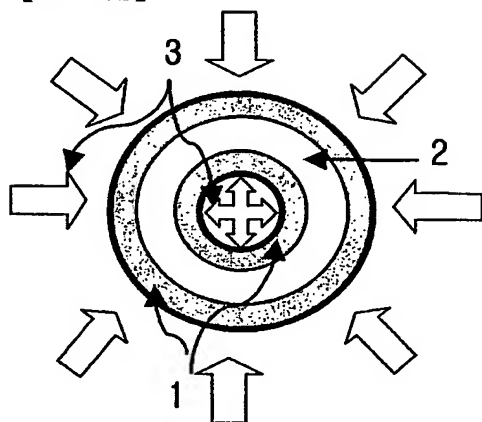


【도 10a】

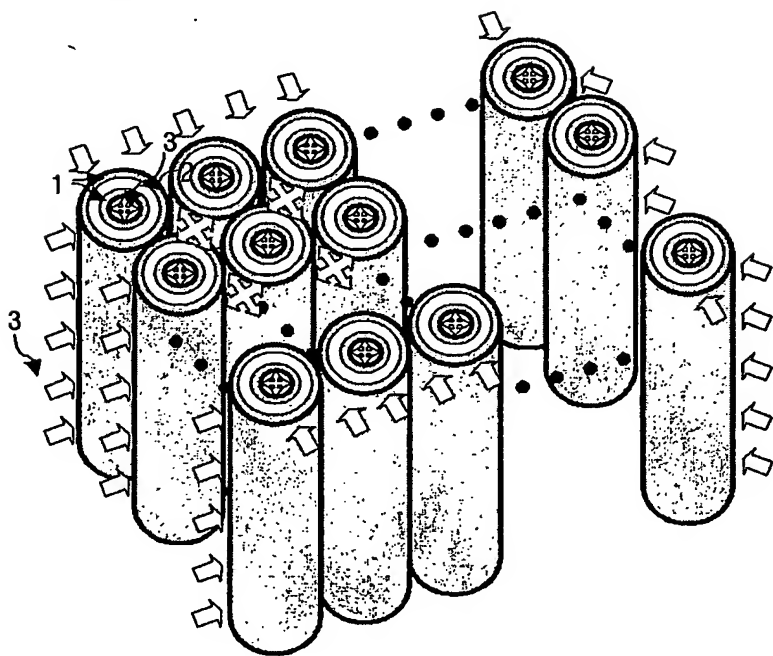


BEST AVAILABLE COPY

【도 10b】

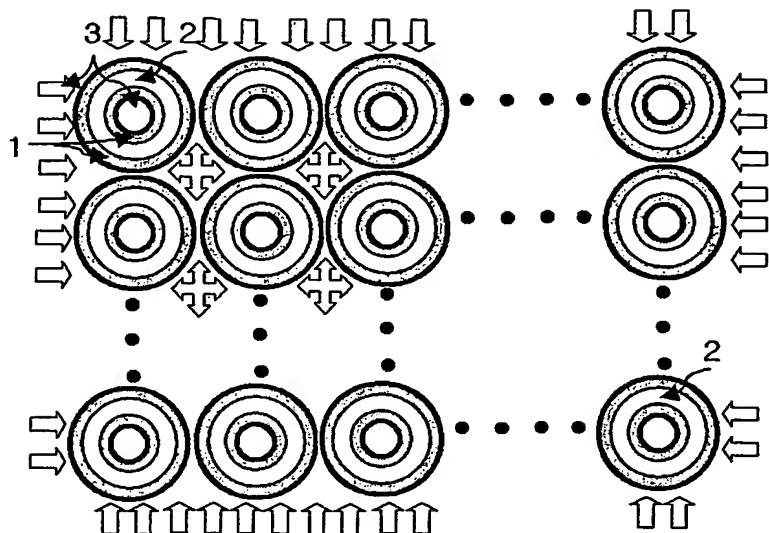


【도 11a】

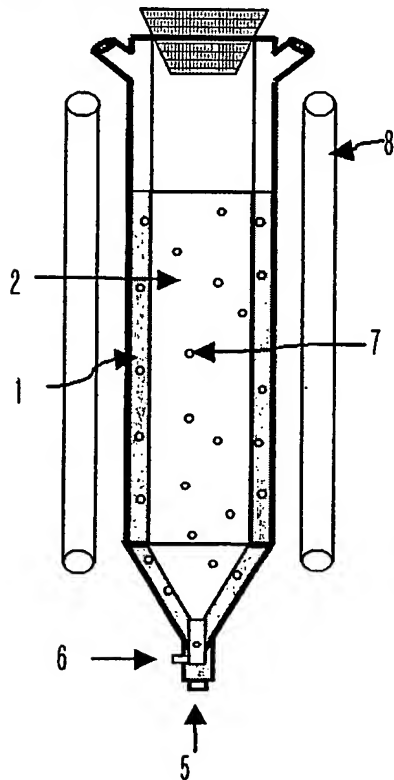


NOT AVAILABLE COPY

【도 11b】

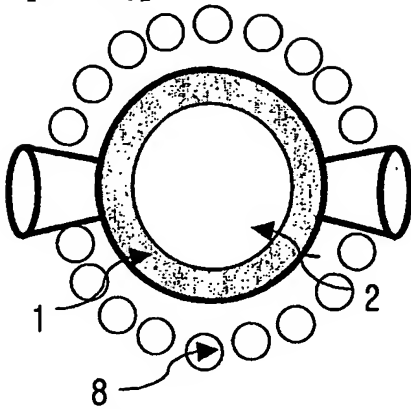


【도 12a】

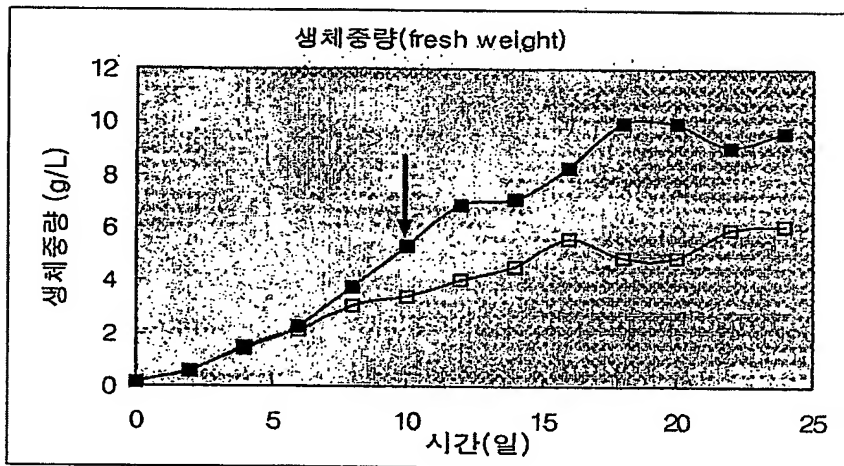


Copyright © 2004 by KIPR

【도 12b】



【도 12c】



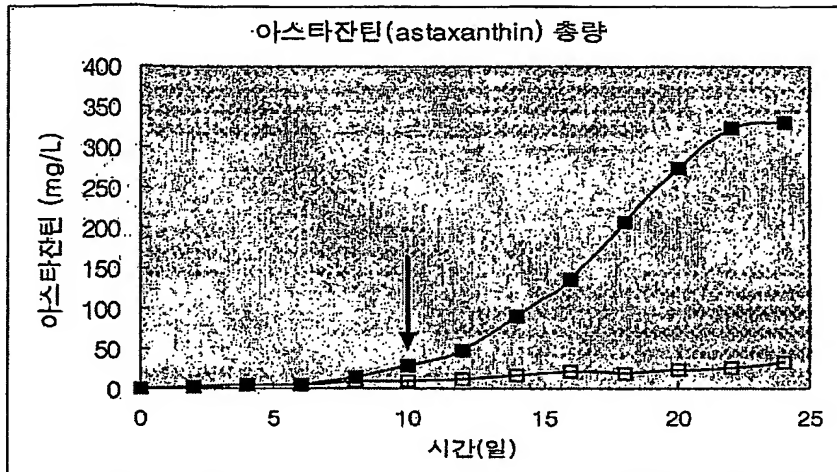
■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

NOT AVAILABLE COPY



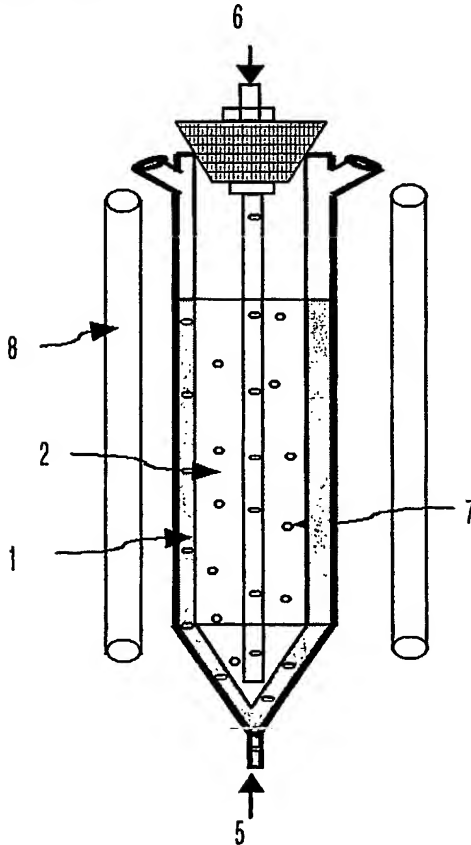
【도 12d】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

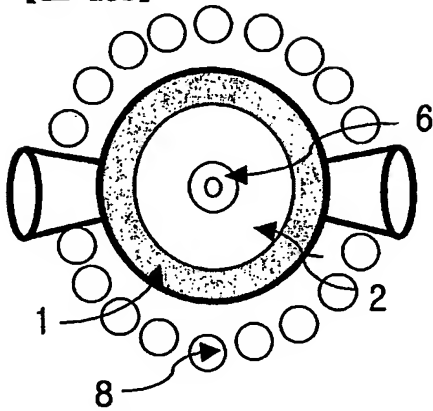
□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

【도 13a】

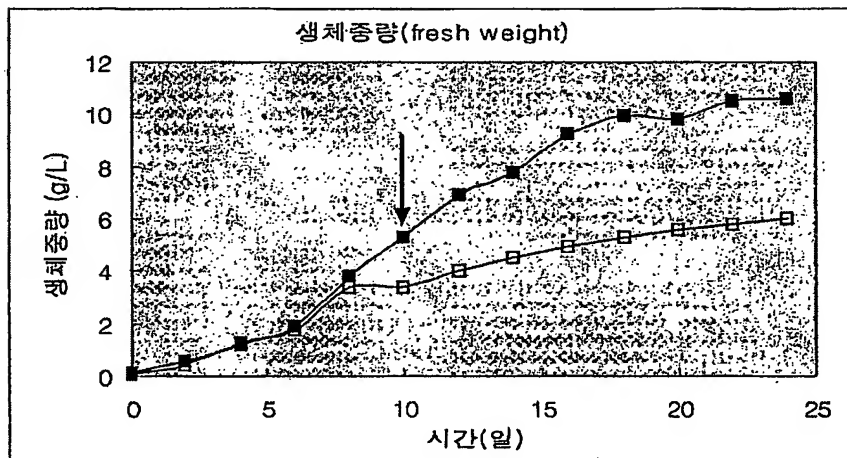


NOT FOR PUBLICATION

【도 13b】



【도 13c】

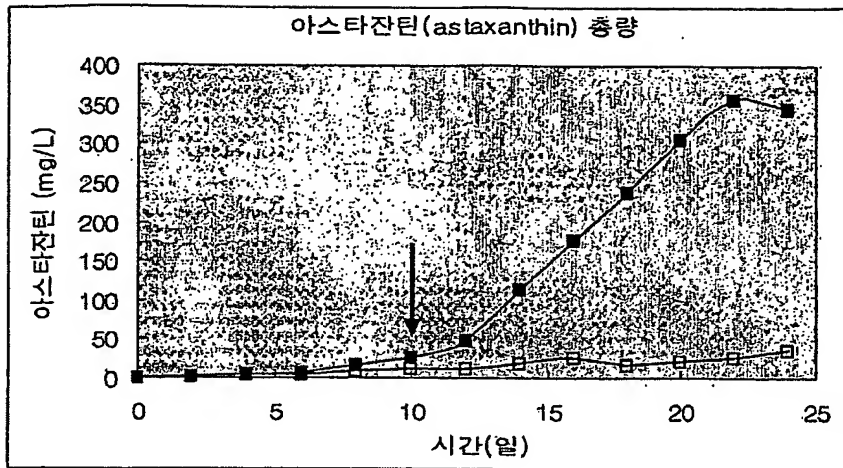


■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

2004 FEB 23 PM 1:11

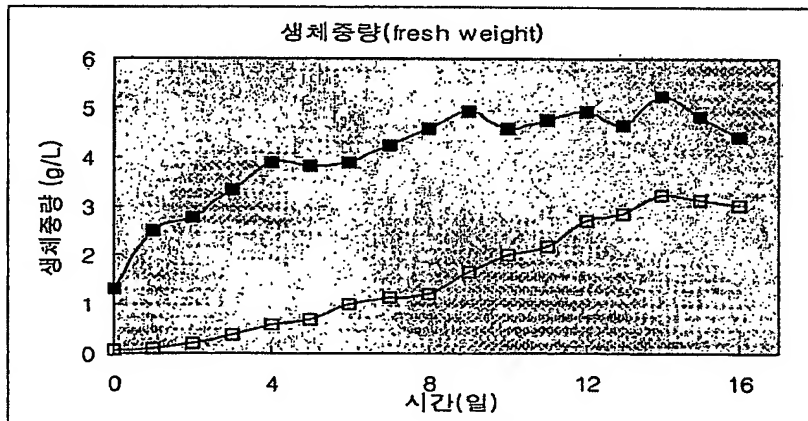
【도 13d】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

【도 14a】

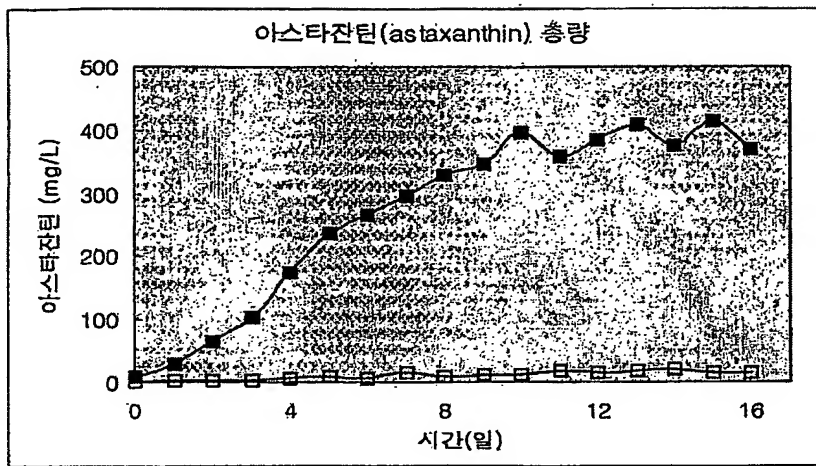


■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

LIST AVAILABLE COPY

【도 14b】



■ : 외부재킷(유용산물 생산용 배양영역)

□ : 내부코어(균체 성장용 배양영역)

2004 FEB/MAR/15TH